

Transfer- RNA und Zellteilung:
Sequenzanalyse zweier lysinspezifischer tRNAs
aus Säugerzellen
verschiedener Zellteilungsraten
(Kaninchenleber und SVT2- Zellen)

Manfred Raba

-

1976

Transfer- RNA und Zellteilung:
Sequenzanalyse zweier lysinspezifischer tRNAs
aus Säugerzellen verschiedener Zellteilungsraten
(Kaninchenleber und SVT2- Zellen).

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

Vorgelegt
von
Manfred Raba
aus
Augsburg

1976



1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Zillig
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann
- Tag der mündlichen Prüfung: 20.7.1976

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München in der Abteilung "Organische Chemie und Spektroskopie" (Direktor: Prof. Dr. Heinz Dannenberg, verstorben am 13. 2. 1975) unter der Anleitung von Herrn Dr. habil. H.J. Gross in der Zeit von November 1972 bis Dezember 1975 durchgeführt.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Herrn Dr. H.J. Gross für seine stete Hilfe, wertvolle Anregungen und zahlreiche kritische Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. U.L. RajBhandary und seiner Gruppe vom MIT, Cambridge, Mass., USA, danke ich für gute Zusammenarbeit.

Herrn Dr. J.R. Katze, Los Angeles, danke ich für tRNA₄^{Lys} aus SVT2- Zellen.

Herrn Prof. Dr. R. Schindler, Basel und Frau Dr. M. Burghagen (MPI) bin ich für die Züchtung von P815 Mäuse-Mastoma Zellen dankbar.

Herrn Dr. M. Saneyoshi, Tokyo, bin ich für die Überlassung einer unveröffentlichten Vorschrift zur zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie zu Dank verpflichtet.

Herrn Dr. W. Schäfer sowie Frau L. Schellong danke ich für die Aufnahme von Massenspektren.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frl. Heidi Alberty für vorzügliche Hilfe bei der Durchführung meiner Versuche sowie den anderen Kollegen der Arbeitsgruppe für anregende Diskussionen.

Inhaltsverzeichnis:

	Seite
1. Einleitung	1
2. Problemstellung	4
3. Ergebnisse	7
3.1. Isolierung von tRNA ₃ ^{Lys} aus Kaninchenleber	7
3.1.1. Darstellung von Kaninchenleber- tRNA	7
3.1.2. Reinigung an DEAE- Zellulose Sephadex A-50	7
3.1.3. Fraktionierung an benzoylierter DEAE- Zellulose (BD- Zellulose)	9
3.1.4. Chromatographie an RPC-5	10
3.2. Präparative Spaltung von Kaninchenleber-tRNA ₃ ^{Lys} mit Ribonuklease T ₁ aus Aspergillus oryzae und Säulenchromatographie an DEAE-Zellulose	11
3.3. Entsalzen der Oligonukleotide über DEAE-Zellulose	14
3.4. Charakterisierung der über die "Tener"- Säule getrennten Ribonuklease T ₁ - Fragmente	15
3.4.1. Nomenklatur	15
3.4.1.1. Nukleotidanalyse der gesamten tRNA ₃ ^{Lys} mittels Spaltung durch Ribonuklease T ₂	15
3.4.1.2. Allgemeine Analysen der Oligonukleotide aus der Ribonuklease T ₁ - Spaltung	17
3.4.2. Sequenzierung der einzelnen Ribonuklease T ₁ - Oligonukleotide	17
3.4.2.1. Nukleotidsequenz von T ₁ 1 (CCA)	18

	Seite
3.4.2.2. Charakterisierung von T ₁ 2 (Gp)	19
3.4.2.3. Nukleotidsequenz von T ₁ 3 (CG)	20
3.4.2.4. Nukleotidsequenz von T ₁ 4 (AG)	20
3.4.2.5. Nukleotidsequenz von T ₁ 5 (DCG)	21
3.4.2.6. Nukleotidsequenz von T ₁ 6 (DAG)	23
3.4.2.7. Identität von T ₁ 7 (pGp)	23
3.4.2.8. Nukleotidsequenz von T ₁ 8 (UUCG)	24
3.4.2.9. Nukleotidsequenz von T ₁ 9 (CCCg)	26
3.4.2.10. Nukleotidsequenz von T ₁ 10 (Tm ⁷ /CAm ¹ AG)	27
3.4.2.10.1. Das Fragment Am ¹ AG	28
3.4.2.10.2. Identifizierung von Tm ⁷	29
3.4.2.10.4. Zusammenstellung der Oligonukleotidsequenz von T ₁ 10	33
3.4.2.11. Nukleotidsequenz von T ₁ 11 (AUAm ² G)	34
3.4.2.12. Nukleotidsequenz von T ₁ 12 (CUCAG)	34
3.4.2.13. Nukleotidsequenz von T ₁ 13 (m ⁷ GDm ⁵ Cm ⁵ CAG)	36
3.4.2.14. Nukleotidsequenz von T ₁ 14 (UCCCUG)	38
3.4.2.15. Nukleotidsequenz von T ₁ 15 (CA ⁷ CAG)	40
3.4.2.16. Nukleotidsequenz von T ₁ 16 (ACUSUUXA ⁷ CUG)	43
3.4.2.16.1. Die Teilsequenz XA ⁷	43
3.4.2.16.2. Die Teilsequenz SU	45
3.4.2.16.3. Identifizierung von U und G	46
3.4.2.16.4. Die Teilsequenz AC	46
3.4.2.16.5. Identifizierung von C	46
3.4.2.16.6. Experimente zur Ableitung der Sequenz von ACUSUUXA ⁷ CUG	47

3.4.2.17.	Zusammenstellung der Sequenzierungsmethoden der Ribonuklease T_1 - Fragmente von T_1 1 bis T_1 16	52
3.4.2.18.	Unmittelbare Überlappungsstellen zwischen Ribonuklease T_1 - und Ribonuklease A- Fragmenten	58
3.5.	Sequenzierung von Kaninchenleber- $tRNA_3^{Lys}$ - Ribonuklease T_1 - Fragmenten mittels radioaktiver Techniken	60
3.6.	Partialspaltungen und Ableitung der Nukleotidsequenz von Kaninchenleber- $tRNA_3^{Lys}$	66
3.6.1.	Nukleotidzusammensetzung der Fragmente IA bis IE	67
3.6.2.	Sequenzierung des Partialfragments IIIB	71
3.6.3.	Verknüpfung der Partialfragmente IE und IIIB	74
3.6.4.	Charakterisierung des Fragments IVD	75
3.6.5.	Verknüpfung von IIIB und IVD	81
3.6.6.	Zusammenstellung der Ergebnisse aus der Mg^{2+} - katalysierten alkalischen Hydrolyse und die Nukleotidsequenz von Kaninchenleber- $tRNA_3^{Lys}$	81
3.7.	Zusammenstellung der Ergebnisse aus der Sequenzanalyse von $tRNA_3^{Lys}$ aus Kaninchenleber	84
3.8.	Sequenzstudien zu den minoren Lysin- $tRNA$ - Spezies nach Säulenchromatographien an DEAE-Sephadex A-50 und RPC-5	85
3.9.	Sequenzierung einer weiteren lysinspezifischen $tRNA$	88
3.9.1.	Spaltung von SVT2- $tRNA_4^{Lys}$ mit Ribonuklease T_1 und Ribonuklease A	91

3.9.2.	Sequenzierung der pankreatischen Fragmente von SVT2- tRNA ₄ ^{Lys}	92
3.9.3.	Sequenzierung der nach Spaltung mit Ribonuklease T ₁ erhaltenen Oligonukleotide von tRNA ₄ ^{Lys} aus SVT2- Zellen	98
3.9.4.	Nukleotidsequenz von tRNA ₄ ^{Lys} aus SVT2-Zellen	103
4.	Diskussion	109
5.	Experimenteller Teil	120
5.1.	Material und Geräte	120
5.1.1.	Enzyme	120
5.1.2.	Materialien für die Säulenchromatographien	121
5.1.3.	Radioaktive Verbindungen und Röntgenfilme	121
5.1.4.	Nukleoside und Nukleotide	121
5.1.5.	Dünnschichtchromatographie	122
5.1.6.	Hochspannungselektrophorese	122
5.1.7.	Geräte	122
5.2.	Methoden	123
5.2.1.	Verwendung von Ionenaustauschern	123
5.2.1.1.	Herstellung von RPC-5	123
5.2.1.2.	Vorbereitung von Ionenaustauschern	124
5.2.2.	Präparation von Aminoacyl- tRNA- Synthetase aus Kaninchenleber	125
5.2.3.	Aminoacylierung von Kaninchenleber- tRNA	125
5.2.4.	Isolierung von Kaninchenleber- tRNA	126

	Seite
5.2.4.1. Phenolextraktion	126
5.2.4.2. Erste Äthanol-fällung	126
5.2.4.3. Adsorption an DEAE- Zellulose	127
5.2.4.4. Zweite Äthanol-fällung	127
5.2.4.5. Isopropanol-fällung	128
5.2.5. Isolierung reiner tRNA ₃ ^{Lys} aus Kaninchen-leber	128
5.2.5.1. Säulenchromatographie an DEAE- Sephadex A-50	128
5.2.5.2. Chromatographie an benzoylierter Zellulose	129
5.2.5.3. Chromatographie an RPC-5	130
5.2.5.4. Fraktionierung der Oligonukleotide an der "Tener"- Säule	131
5.2.5.5. Entsalzen von Oligonukleotiden über DEAE-Zellulose DE23	132
5.2.6. Inkubationsansätze für Spaltungen von Oligonukleotiden mit verschiedenen Enzymen	132
5.2.6.1. Ribonuklease T ₁ aus Aspergillus oryzae (Ribonuclease- guanine- nucleotide-2'-transferase, cyclizing, E.C. 3.1.4.8)	132
5.2.6.2. Ribonuklease T ₂ aus Aspergillus oryzae (Ribonuclease-3'-oligonucleotide- hydrolase, E.C. 3.1.4.23)	133
5.2.6.3. Ribonuklease A aus Rinderpankreas und alkalische Phosphatase aus E.coli (Ribonuclease- pyrimidine- nucleotide-2'-transferase, cyclizing, E.C. 3.1.4.22; orthophosphoric-monoester- phosphorylase, alkaline optimum, E.C. 3.1.3.1)	133

5.2.6.4.	Schlangengiftphosphodiesterase aus <i>Crotalus Adamanteus</i> (Orthophosphoric-diester- phospho- hydrolase, E.C. 3.1.4.1)	134
5.2.6.5.	Ribonuklease U_2 aus <i>Ustilago sphaerogena</i> (Ribonucleate- purine- nucleotide-2'-transferase, cyclizing, E.C. 3.1.4.-)	135
5.2.6.6.	Polynukleotidphosphorylase aus <i>Micrococcus lysodeicticus</i> (Polynucleotide: orthophosphate- nucleotidyltransferase, E.C. 2.7.7.8)	135
5.2.7.	Dünnschichtchromatographie	136
5.2.7.1.	Zur Identifizierung von Nukleosiden	137
5.2.7.2.	Zur Identifizierung von 3'- und 5'-Nukleotiden	137
5.2.7.3.	Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie	137
5.2.7.3.1.	Mononukleotide aus Spaltung mit Ribonuklease T_2	137
5.2.8.	Behandlung von Oligonukleotiden mit N-cyclo- hexyl- β -[4-methylmorpholinium]- äthyl-carbodiimid-p-toluolsulfonat (CMCT)	138
5.2.9.	Der Whitfeld- Abbau	139
5.2.10.	UV- Spektroskopie	140
5.2.11.	"Klassische" Sequenzierung: Charakterisierung von Oligonukleotiden	141
5.2.12.	Darstellung von γ -[^{32}P]- ATP	142
5.2.13.	Spaltung von Kaninchenleber $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ mit Ribonuklease T_1 (bzw. Ribonuklease A) und alkalischer Phosphatase; [^{32}P]- Markierung mittels γ -[^{32}P]- ATP und anschließender zweidimensionaler Hochspannungselektrophorese	144

	Seite
5.2.14. Autoradiographie	146
5.2.15. Partialspaltungen der [^{32}P]- markierten Oligonukleotide mit Schlangengiftphospho- diesterase	146
5.2.15.1. Messung der Radioaktivität und Elution	146
5.2.15.2. Endgruppenbestimmungen	147
5.2.15.3. Schlangengiftphosphodiesterasespaltung der [^{32}P]- markierten Oligonukleotide	148
5.2.16. Homochromatographie	149
5.2.16.1. Herstellung von Homochromatographie- lösungen	150
5.2.16.2. Schlangengiftphosphodiesterasespaltung und zweidimensionale Hochspannungselektro- phorese/Homochromatographie	151
5.2.17. Radioaktive Arbeitstechniken: Methodik	152
6. Zusammenfassung	154
7. Literaturverzeichnis	158
8. Lebenslauf	169

Abkürzungsverzeichnis:

DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
tRNA ^{Lys}	lysinspezifische Transfer- Ribonukleinsäure
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	Diäthylaminoäthyl-
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TEAB	Triäthylammoniumbicarbonat
TCA	Trichloressigsäure ("trichloroacetic acid")
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
UV	Ultraviolett
A ₂₆₀	Optische Dichte ("absorbance") bei einer Wellenlänge von 260 nm und bei 1 cm Schichtdicke
R _f	Chromatographische Mobilität bezogen auf die Lösungsmittelfront
B	Blauer Farbstoff "Xylene Cyanol FF" als Marker bei Hochspannungselektrophoresen und Homochromatographien
Oligonukleotide	Auf die Angabe der Phosphodiesterbindungen wurde verzichtet; nur bei besonders wichtigen Fällen wurde zur Verdeutlichung ein p zwischen die Nukleosidsymbole eingefügt.

Nukleoside und Nukleotide:

A	Adenosin
U	Uridin

C	Cytidin
G	Guanosin
m ¹ A	1- Methyladenosin
m ² G	N ² - Monomethylguanosin
m ⁷ G	7- Methylguanosin
m ⁵ C	5- Methylcytidin
m ⁵ U = T	Ribothymidin
Tm	2'O- Methylribothymidin
ψ	Pseudouridin
D	5,6- Dihydrouridin
X	Nukleosid neben dem 3'- Ende des Anticodons von tRNA ^{Lys} ₃
S	Erster Buchstabe des Anticodons von tRNA ^{Lys} ₃
mcm ⁵ s ² U	2- Thio-5-carboxymethyluridin- methylester
3'- Nukleotide	Anhängen eines p an das Nukleosid- symbol
5'- Nukleotide	Vorstellen eines p vor das Nukleo- sidsymbol

1. Einleitung

Für die korrekte Weitergabe der genetischen Informationen an die Tochtergenerationen ist die Fähigkeit der Organismen zur semikonservativen Reduplikation verantwortlich. Nur dadurch können bei der Mitose die Nachkommen denselben Genbestand behalten.

Die in der Nukleotidsequenz der Desoxyribonukleinsäure gespeicherten Informationen für Proteinprimärstrukturen werden nicht unmittelbar verwirklicht, sondern in zwei aufeinanderfolgenden Stufen, der Transkription (1) und der Translation (2).

Die Transkription (1) vollzieht sich bei Eukaryonten im Kern. An der Desoxyribonukleinsäure als Matrix werden die entsprechenden Botschaften abgelesen und in den komplementären Ribonukleinsäuren fixiert. Zu diesen primären Genprodukten zählen die Boten - oder messenger - Ribonukleinsäuren (mRNAs), die ribosomalen Ribonukleinsäuren (rRNAs) und die Transfer - Ribonukleinsäuren (tRNAs).

Im zweiten Schritt, der Translation (2-5), wandern die Ribonukleinsäuren in das Cytoplasma, wo sich die rRNAs am Aufbau der Ribosomen beteiligen. Je drei aufeinanderfolgende Nukleotide der mRNA bilden eine Informationseinheit, ein Codon (6), das einer der zwanzig verschiedenen, natürlich vorkommenden Aminosäuren entspricht.

Bei der Synthese eines Proteins, dem sekundären Genprodukt, spielt die tRNA eine entscheidende Rolle. Sie akzeptiert am 3'-Ende spezifisch "ihre" Aminosäure unter Ausbildung einer energiereichen Bindung und wandert zum Ort der Proteinbiosynthese, dem Komplex aus Ribosom und mRNA (7).

Holley und Mitarbeiter berichteten 1965 von der ersten Nukleotidsequenz einer alaninspezifischen tRNA aus Hefe (8). Es handelte sich dabei genau um das Molekül, das Crick schon 1955 in seiner Adaptorhypothese (9) gefordert hatte und das Hoagland et al. (10), sowie Ogata und Nohara bald darauf tatsächlich gefunden hatten (11).

Zachau et al. stellten kurz darauf die Sequenzen von zwei serinspezifischen tRNAs aus Hefe vor (12). Inzwischen kennt man die Primärstrukturen von mehr als sechzig tRNAs aus verschiedenen Organismen.

Alle Nukleotidsequenzen von tRNAs lassen sich zu einem "Kleeblatt" anordnen (Abbildung 1). Das Kleeblatt läßt sich grundsätzlich in vier doppelsträngige Regionen mit Basenpaarung (Aminosäureakzeptorstamm, Dihydrouridinstamm, Anticodonstamm und GT³C - Stamm) einteilen. Mit Ausnahme des Aminosäureakzeptorstammes besitzen alle anderen einen Bereich ohne Basenpaarung, die Schleifen, deren Bezeichnungen mit denen der Stammregionen korrespondieren.

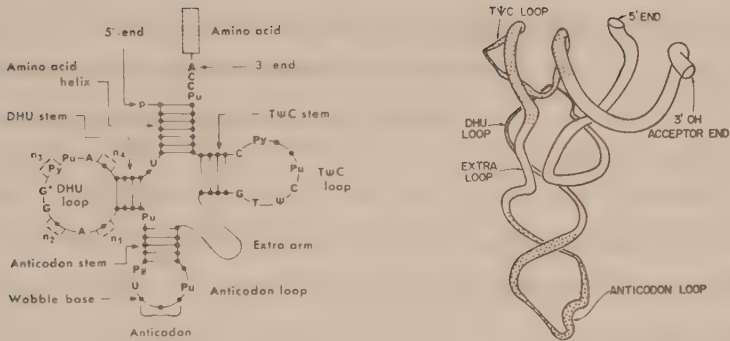


Abb.1: Zweidimensionale Darstellung von tRNAs unter Berücksichtigung der wichtigsten Strukturmerkmale (links) und dreidimensionale Darstellung (rechts).

Die Größe des "Extraloops" läßt sich nur ungenau festlegen; in verschiedenen tRNAs ist er unterschiedlich stark ausgebildet.

Neben dem 3'- Ende der tRNA mit der CCA - Sequenz, an deren terminalem Adenosinrest die Aminosäure mit dem 2'- oder 3'- OH der Ribose verbunden vorliegt (13-15), ist die Anticodonschleife mit dem Anticodon, drei aufeinanderfolgenden Nukleotiden, von besonderer Bedeutung. Wie Chapville und Benzer (16,17) eindrucksvoll nachwiesen, sind diese drei Nukleotide die Erkennungsfunktion für das komplementäre

Codontriplett der mRNA.

Die Nukleotidfolge GT Ψ C in der GT Ψ C - Schleife kann mit der korrespondierenden Sequenz der ribosomalen 5S RNA in Wechselwirkung treten und wird deshalb als Ribosomenbindungssequenz bezeichnet (18-21).

Die Bedeutung der Dihydrouridinschleife für die Funktionen und Eigenschaften von tRNAs ist bis heute noch nicht befriedigend geklärt.

In den letzten Jahren gelang es mehreren Arbeitsgruppen, konkrete Vorstellungen bezüglich der Tertiärstruktur von tRNAs (22,23) zu entwickeln (Abbildung 1, Seite 3).

2. Problemstellung

Bei Routineuntersuchungen von tRNAs aus Kaninchenleber hatten H.J. Gross und Mitarbeiter in der Spezies tRNA₃^{Lys} das Fehlen von Ribothymidin (T) beobachtet. Da dieses seltene Nukleosid in fast allen tRNAs als Bestandteil der Ribosomenbindungssequenz enthalten ist, stellte sich die Frage nach der Struktur und Funktion dieser Sequenz in tRNA₃^{Lys}.

Neben den "klassischen" Techniken zur Ermittlung der Nukleotidsequenz sollten auch radioaktive Methoden erprobt werden. Die 5'- Phosphorylierung von Oligonukleotiden in vitro

mittels Polynukleotidkinase und ihre Charakterisierung nach zweidimensionaler Hochspannungselektrophorese sollte angewendet und die resultierenden Ergebnisse mit denen der "klassischen" Sequenzierung verglichen werden.

Transfer - RNAs aus Säugerzellen enthalten mehrere lysin-spezifische Spezies, von denen sich eine durch ungewöhnliche Eigenschaften auszeichnet. Ortwerth und Mitarbeiter (24,25) hatten gezeigt, daß annähernd lineare Korrelation zwischen der Menge an $tRNA_4^{Lys}$ und der Zellteilungsrate des entsprechenden Gewebes existiert; Zellen, die sich nicht teilen, enthalten jedoch keine $tRNA_4^{Lys}$.

Die Sequenzierung dieser Transfer - RNA und der Vergleich ihrer Nukleotidzusammensetzung mit anderen lysinakzeptierenden Spezies aus Säugerzellen sollte darüber Aufschluß geben, ob die $tRNA_4^{Lys}$ das Transkriptionsprodukt eines eigenen Gens ist, oder durch Hypo - bzw. Hypermodifizierung aus einer derjenigen Lysin - tRNAs hervorgeht, die auch in ruhenden Zellen vorkommt.

Neuere Ergebnisse von Yang et al. (26,27) besagten, daß eine der Hauptspezies der Lysin - tRNAs aus embryonalen Hühnerzellen an die 35S RNA von AM - Viren (Avian Myeloblastosis) hybridisiert.

Es waren somit im Rahmen dieser Arbeit folgende Fragen zu

beantworten:

1. Durch welches Nukleosid ist Ribothymidin in $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ und anderen Lysin - tRNAs ersetzt?
2. Ist die mit der Zellteilung bei Eukaryonten assoziierte $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$ das Produkt eines eigenen Gens, oder geht sie aus einer der "normalen" Lysin - tRNAs durch Unter - bzw. Übermodifikation hervor?

Beide Fragen sollten durch die Ermittlung der Nukleotidsequenzen von $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ und $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$ beantwortet werden.

Die Nukleotidsequenz von $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ aus Kaninchenleber wurde zusammen mit K. Limburg erarbeitet (28).

3. Ergebnisse

3.1. Isolierung von tRNA₃^{Lys} aus Kaninchenleber

3.1.1. Darstellung von Kaninchenleber-tRNA

Zur Gewinnung von tRNA aus Kaninchenleber wurde die Methode von M. Staehelin et al. angewendet (29).

Diese Aufarbeitung gliedert sich im wesentlichen in Phenolisierung, Adsorption des zu isolierenden Materials an DEAE-Zellulose, sowie mehrere Äthanol-fällungen. Im letzten Arbeitsschritt erhielt man das tRNA Gemisch durch eine fraktionierte Fällung mit Isopropanol. In den verschiedenen Präparationen schwankte die Ausbeute zwischen 40 und 60 mg pro 100 gr Kaninchenleber.

3.1.2. Reinigung an DEAE - Zellulose Sephadex A-50

Die Verwendung dieses Austauschers brachte eine ausgezeichnete Trennung bezüglich der Spezies tRNA₃^{Lys} (Abbildung 2). Diese Transfer - RNA erschien im Elutionsprofil in einem Bereich niederer optischer Dichte, während die Hauptmenge der tRNA Populationen in einem breiten Maximum bei geringeren Salzkonzentrationen auftrat.

Die vier Fraktionsbereiche, die bei der Aminoacylierungsreaktion mit ³H - Lysin Gipfel im Akzeptorverhalten auf-

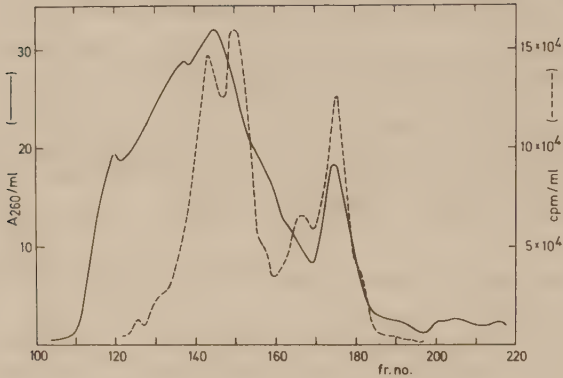


Abb. 2: Reinigung von unfractionierter tRNA an DEAE - Zellulose Sephadex A-50. Säulendimensionen: 150 x 2 cm. Die Säule wurde mit 2 gr unfractionierter tRNA beschickt. Die Elution erfolgte mit einem linearen Kochsalzgradienten von 0,31 M NaCl (2,5 l) bis 0,41 M NaCl (2,5 l) in 0,01 M MgCl_2 und 0,02 M Tris - HCl pH7,5. Das Fraktionsvolumen betrug 12 ml, die Tropfgeschwindigkeit der Säule 5 Sekunden pro Tropfen. Beim Test auf Lysinakzeptoraktivität (30) traten drei Hauptbereiche mit Radioaktivitätsgipfeln und eine minore Spezies auf. Die Lysin - tRNA, die im Elutionsprofil bei der höchsten Salzkonzentration auftrat, erhielt die Bezeichnung " $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ ".

wiesen, wurden getrennt gesammelt und mit dem 2,5 - fachen Volumen Äthanol gefällt.

3.1.3. Fraktionierung an benzoylierter DEAE - Zellulose (BD - Zellulose)

Als zweiter Reinigungsschritt wurde eine Fraktionierung des an DEAE - Zellulose Sephadex A-50 angereicherten $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ Fraktionsbereiches an BD - Zellulose ausgeführt (Abbildung 3).

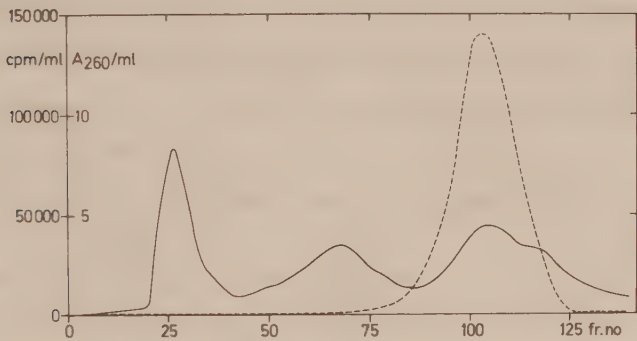


Abb. 3: Chromatographie an BD - Zellulose. Säulendimensionen: 84 x 1,3 cm. Die Fraktionierung erfolgte an einem linearen Kochsalzgradienten von 0,45 M NaCl (600 ml) bis 1 M NaCl - 10% Äthanol (600 ml) in 0,01 M MgCl_2 . Gesammelt wurden 4,5 ml Fraktionen; die Tropfgeschwindigkeit betrug 4 Sekunden pro Tropfen. Aminoacylierungsteste zeigten einen Bereich mit Lysinakzeptoraktivität.

Das Elutionsmuster zeigte drei Maxima mit optischer Dichte, wobei das erste ribosomale 5S RNA war und das zweite nicht weiter charakterisiert wurde. Unter dem letzten Gipfel befand sich $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$, die nach diesem Schritt schon sehr rein vorlag.

3.1.4. Chromatographie an RPC-5

In den letzten Jahren hat sich die "reversed phase"- Chromatographie zur Trennung von Ribonukleinsäuren bestens bewährt. Bei dieser Technik ist im Gegensatz zu anderen Säulenchromatographien (flüssig - flüssig) die weniger polare Phase stationär, während die polarere die mobile Phase darstellt. Die Anwendung dieser Methode nach Kelmers und Mitarbeitern (31) zeigte einen deutlichen Reinigungseffekt (Abbildung 4).

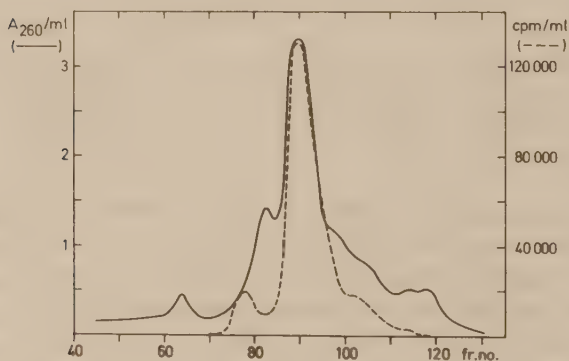


Abb. 4: Es wurde eine Hochdrucksäule mit den Abmessungen 100 x 1,2 cm eingesetzt. 114 A_{260} - Einheiten $tRNA_3^{Lys}$ aus der BD - Säule (Abb. 3) wurden aufgetragen. Die Fraktionierung erfolgte mit einem linearen Kochsalzgradienten von 0,45 M NaCl (300 ml) bis 0,8 M NaCl (300 ml) in 0,01 M Natriumacetat pH 4,4, 0,01 M $MgCl_2$, 0,001 M Merkaptoäthanol und 0,01% Natriumazid. Die

Tropfgeschwindigkeit betrug unter Anwendung eines Drucks von 12 kg/cm^2 3,5 Sekunden; das Fraktionsvolumen wurde auf 2,8 ml eingestellt. Aminoacylierungsteste zeigten die Auflösung von zwei lysinakzeptierenden Bereichen, wobei der höchste Aktivitätsgipfel $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ entsprach.

Die beiden lysinakzeptierenden Fraktionsbereiche wurden getrennt gesammelt und mit dem 2,5 - fachen Volumen an Äthanol gefällt. Die Hauptspezies stand für $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$, deren hohe Reinheit nach diesen drei säulenchromatographischen Stufen (ca. 1800 pM/A_{260} - Einheit) sich im Verlaufe der ausgeführten Untersuchungen immer wieder bestätigte.

Später wird gezeigt werden, daß die minoren Spezies (vgl. Abb. 3 und Abb. 4) sich von der Hauptspezies $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ durch ein fehlendes Adenosin am 3'- Ende unterscheiden.

3.2. Präparative Spaltung von Kaninchenleber- $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ mit Ribonuklease T_1 aus *Aspergillus oryzae* und Säulenchromatographie an DEAE - Zellulose

Zur Sequenzierung einer tRNA ist es nötig, den Ribonukleotidstrang zuerst in kleinere Bruchstücke zu zerlegen. Dazu werden Spaltungen mit den Ribonukleasen T_1 und A herangezogen. Ribonuklease T_1 spaltet die Phosphodiesterbindung auf der 3'- Seite von Guanotin und einigen seiner Derivate, wobei bei aufeinanderfolgenden Guanotinen Guanotin 3'- Phosphat gebildet wird (3'- Mononukleotide); daneben entstehen Oligo-

nukleotide, die am 3'- terminalen Ende stets ein Guanosin 3'- Phosphat tragen. Ribonuklease A ist pyrimidinspezifisch und spaltet auf der 3'- Seite von Cytidinen und Uridinen, sowie den meisten Derivaten, wobei Pyrimidin 3'- Phosphate und Oligonukleotide mit 3'- ständigem Pyrimidinphosphat entstehen.

Die enzymatische Hydrolyse mit Ribonuklease T_1 und Sequenzierung der resultierenden Fragmente werden in der vorliegenden Arbeit abgehandelt, während die Charakterisierung der pankreatischen Spaltstücke Grundlage zur Dissertation von K. Limburg (28) war.

Die präparative Spaltung von Kaninchenleber $tRNA_3^{Lys}$ mit Ribonuklease T_1 und anschließende säulenchromatographische Fraktionierung des resultierenden Hydrolysats an der "Tener"-Säule (32) ergab eine Auflösung der entstandenen Oligonukleotide entsprechend ihrer Kettenlänge (Abbildung 5).

Mit zunehmender Kettenlänge wurden zuerst die Mononukleotide sowie anschließend Oligonukleotide steigender Kettenlänge eluiert. Wie aus Abbildung 5 hervorgeht, konnten sechzehn Maxima mit optischer Dichte voneinander separiert werden, die getrennt gesammelt, ihrer Identifizierung zugeführt wurden.

Trennungskriterien der Säule waren nicht allein Kettenlänge

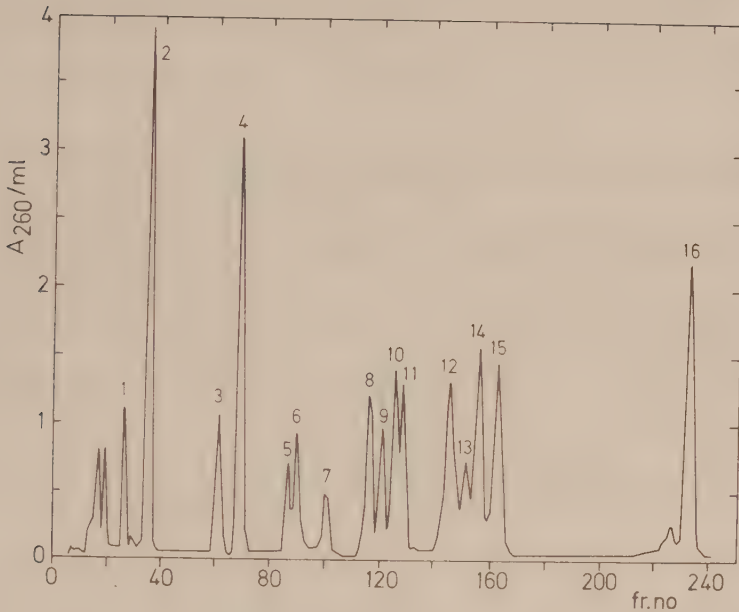


Abb. 5: Fraktionierung eines Ribonuklease T_1 - Hydrolysats von $tRNA_3^{Lys}$ an einer DEAE - Zellulose - Säule in 7 M Harnstoff. Säulendimensionen: 140 x 0,6 cm. 300 A_{260} Einheiten $tRNA_3^{Lys}$ wurden mit Ribonuklease T_1 inkubiert (Bedingungen siehe 5.2.6.1.), auf die Säule aufgetragen und mit einem linearen Kochsalzgradienten von 0,05 M NaCl (1200 ml) bis 0,45 M NaCl (1200 ml) in 7 M Harnstoff und 0,02 M Tris-HCl pH 7,5 entsprechend den unterschiedlichen Kettenlängen eluiert. Tropfgeschwindigkeit: 14 Sekunden pro Tropfen. Das Fraktionsvolumen betrug 4,8 ml.

(genauer: Zahl negativer Ladungen) sondern auch die Basenzusammensetzung der einzelnen Fragmente. Purinreiche Oligonukleotide erschienen im Elutionsmuster später als pyrimidinreiche vergleichbarer Kettenlänge.

3.3. Entsalzen der Oligonukleotide über DEAE - Zellulose

Bei der Charakterisierung der isolierten Oligonukleotide stört der vorhandene Harnstoff die auszuführenden Sequenzierungsmethoden empfindlich. Einen Ausweg bot die Chromatographie der einzelnen Oligonukleotide an DEAE - Zellulose. Die aufgetragenen Oligonukleotide wurden von der DEAE - Zellulose festgehalten, während der Harnstoff mit 0,01 M TEAB pH 8,0 ausgewaschen wurde. Die Wiedergewinnung der gebundenen Oligonukleotide erfolgte durch Elution mit 2 M TEAB pH 8,5. Der TEAB - Puffer ist vollkommen flüchtig und konnte daher im Vakuum entfernt werden.

3.4 Charakterisierung der über die "Tener"- Säule getrennten Ribonuklease T_1 - Fragmente

3.4.1. Nomenklatur

Aus Abbildung 5 sind die Bezeichnungen der T_1 - Oligonukleotide in der Reihenfolge ihrer Elution abzulesen. Die mit den Nummern 1 bis 16 versehenen Bereiche mit optischer Dichte werden durch ein vorgestelltes " T_1 " eindeutig als solche Bruchstücke klassifiziert, die nach Behandlung mit Ribonuklease T_1 entstanden sind.

3.4.1.1. Nukleotidanalyse der gesamten $tRNA_3^{Lys}$ mittels Spaltung durch Ribonuklease T_2

Um erste Hinweise auf die Basenzusammensetzung zu erhalten, wurde die Kaninchenleber $tRNA_3^{Lys}$ und jedes Oligonukleotid mit Ribonuklease T_2 behandelt, wobei der Ribonukleotidstrang in 3'- Mononukleotide zerlegt wurde. Die Trennung der resultierenden Hydrolyseprodukte erfolgte durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie in den Laufmitteln D (1. Dimension) und E (2. Dimension). Die im UV - Licht bei 254 nm sichtbaren Flecken wurden eingezeichnet und die R_f - Werte mit denen von authentischem Material verglichen.

Die Ergebnisse einer Spaltung von Kaninchenleber $tRNA_3^{Lys}$ mit Ribonuklease T_2 sind in der Abbildung 6 aufgezeigt:

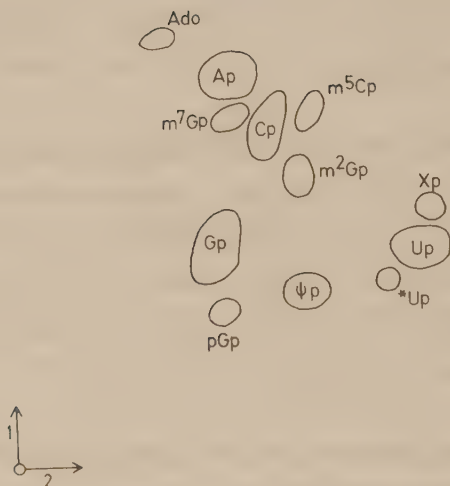


Abb.6: Spaltung von Kaninchenleber $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ mit Ribonuklease T_2 und anschließende zweidimensionale Dünnschichtchromatographie auf DEAE - Zelluloseplatten 20 x 20 cm in den Laufmitteln D und E.

In keinem Experiment konnte Ribothymidin nachgewiesen werden. Statt dessen erhielt man aus der Gesamt - $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ sowie T_1 10 einen Fleck, der bisher unbekannt war und wie Abbildung 6 zeigt, vorläufig mit U^* bezeichnet wurde. Außerdem wurde nach der Spaltung mit Ribonuklease T_2 von $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ und T_1 16 ein stark hellblau fluoreszierender Bereich identifiziert. Dieses Nukleotid, in der Literatur ebenfalls noch nicht beschrieben, wurde mit X angegeben.

3.4.1.2. Allgemeine Analysen der Oligonukleotide aus der Ribonuklease T₁- Spaltung

Jedes Oligonukleotid wurde routinemäßig mit alkalischer Phosphatase behandelt um das endständige Phosphat abzuspalten, weil diese Oligonukleotide bei der Dünnschichtchromatographie in den verwendeten Laufmitteln B oder C eine höhere Mobilität aufwiesen als die entsprechenden Fragmente mit terminalem 3'- Phosphat. Neben einem Reinigungseffekt und einer Vorbereitung für weitere Untersuchungen (z.B. Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase) sollte in diesem Arbeitsgang ein weiteres, eventuell von der "Tener"- Säule bei gleicher Salzkonzentration eluiertes Oligonukleotid abgetrennt werden.

Alle Ribonuklease T₁ - Fragmente wurden auch durch Spaltung mit Ribonuklease T₂ und nachfolgender zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie in den Laufmitteln D und E analysiert.

3.4.2. Sequenzierung der einzelnen Ribonuklease T₁- Oligonukleotide

Der aus der "Tener"- Säule zuerst eluierte Doppelgipfel optischer Dichte konnte eindeutig identifiziert werden: der erste Gipfel enthielt Ribonuklease T₁, der zweite zyklisches Gp (Gp!).

3.4.2.1. Nukleotidsequenz von T₁ 1 (CCA)

Wie oben ausgeführt, bewirkt die Behandlung eines Oligonukleotids mit alkalischer Phosphatase den Verlust des 3'-terminalen Phosphats und dadurch eine Erhöhung der Mobilität in der Dünnschichtchromatographie. Bei T₁ 1 war jedoch der R_f - Wert nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase und anschließender Dünnschichtchromatographie in Laufmittel C identisch mit dem von unbehandeltem Material. Daraus war zu schließen, daß dieses Oligonukleotid schon ohne 3'-terminales Phosphat vorlag. Dieses Phänomen konnte nur dadurch erklärt werden, daß dieses Oligonukleotid die 3'-terminale Gruppe von tRNA₃^{Lys} sein mußte.

Spaltung dieses Fragments mit Ribonuklease T₂ und anschließende zweidimensionale Dünnschichtchromatographie in den Laufmitteln D und E zeigte nur zwei Flecken, die vorläufig als Cp und A zugeordnet werden konnten. Eine Ribonuklease T₂-Spaltung im präparativen Maßstab sollte diesen Sachverhalt aufklären helfen. Das Hydrolysat wurde auf einer Dünnschichtplatte in Laufmittel B getrennt. Aufgetragenes Cp sowie A besaßen denselben R_f - Wert wie die beiden aufgelösten Banden. Vergleiche in den Laufmitteln A und C bestätigten diesen Befund. Das Material wurde von der Dünnschichtplatte mit 0,01 M TEAB pH 8,5 eluiert; durch UV - Spektren bei pH 1, pH 7 und pH 13 wurden die Stoffe als Ap und C identifiziert. Die quantitative Auswertung ergab ein molares Verhältnis

von Cp : A = 2.17 : 1. Somit war die Sequenz dieses Oligonukleotids eindeutig zu CCA bestimmt, da das nach Spaltung mit Ribonuklease T₂ entstandene Adenosin nur am 3'- Ende des Fragments lokalisiert sein kann; das Fehlen von 3'- terminalem Phosphat bestätigte, wie oben ausgeführt, diesen Sachverhalt.

Die Stellung dieses Oligonukleotids in der ganzen tRNA ist eindeutig voraussagbar; es muß das 3'- Ende von tRNA₃^{Lys} darstellen, weil ein Fragment, das im Inneren des Ribonukleotidstranges lokalisiert ist, nach der Spaltung mit Ribonuklease T₂ niemals ein freies 3'- Ende aufweisen kann. Außerdem ist T₁ 1 das einzige Oligonukleotid, das als 3'- terminales Ende kein Guanosin oder Guanosinderivat trägt. Unter der Berücksichtigung der Spezifität von Ribonuklease T₁ muß am 3'- Ende von tRNA₃^{Lys} eine Sequenz GCCA vorliegen.

3.4.2.2. Charakterisierung von T₁ 2 (Gp)

Die Zusammensetzung dieses Bereichs optischer Dichte ließ sich einfach bestimmen. T₁ 2 war resistent gegen den Angriff von Nukleasen und zeigte in der Dünnschichtchromatographie in den Laufmitteln A, B, C, D und E identische R_f - Werte mit authentischem Gp. Die UV - Spektren bestätigten diesen Befund. Ein Guanosinderivat konnte unter diesem Bereich optischer Dichte nicht gefunden werden.

T₁ 2 muß aus solchen Bereichen der tRNA₃^{Lys} stammen, die

aufeinanderfolgend Gp enthalten. Dieser Sachverhalt erklärt das Auftreten des Mononukleotids Gp nach erschöpfender Behandlung mit Ribonuklease T_1 .

Die quantitative Analyse forderte für T_1 2 ca. 6 bis 8 Mol Gp/ Mol $tRNA_3^{Lys}$. Den genauen Wert lieferten die Ergebnisse aus der pankreatischen Sequenzanalyse (28); demnach sind sieben Gp in der Sequenz enthalten.

3.4.2.3. Nukleotidsequenz von T_1 3 (CGp)

Die Spaltung von T_1 3 mit Ribonuklease T_2 lieferte nach Dünnschichtchromatographie in Laufmittel B als Reaktionsprodukte Cp und Gp in einem molaren Verhältnis von Cp : Gp = 0,93 : 1. UV - Spektren der Mononukleotide ergaben keinerlei Abweichung vom erwarteten Sachverhalt. Damit konnte man für das Dinukleotid T_1 3 die Sequenz CG aufstellen.

3.4.2.4. Nukleotidsequenz von T_1 4 (AG)

Nach Spaltung von T_1 4 mit Schlangengiftphosphodiesterase und Dünnschichtchromatographie in Laufmittel B wurden das Nukleosid A und das 5'- Mononukleotid pG gefunden, deren Molverhältnis sich wie 1 : 1,2 verhielt. UV - Spektren bei pH 1, pH 7 und pH 13 bewiesen die Richtigkeit dieses Befundes. Mit diesen Informationen war die Sequenz des Oligonukleotids T_1 4 mit AG eindeutig.

Die quantitative Auswertung von T_1 3 und T_1 4 ergab ein Verhältnis von T_1 3 : T_1 4 = 1 : 2.

Das Elutionsmuster der beiden Gipfel optischer Dichte T_1 3 und T_1 4 bestätigte die Erfahrung, daß purinreiche Oligonukleotide später eluiert werden als solche, die bei gleicher Kettenlänge einen geringeren Purinanteil aufweisen.

3.4.2.5. Nukleotidsequenz von T_1 5 (DCGp)

Nach der Fraktionszahl zu urteilen, bei der T_1 5 und T_1 6 im Ribonuklease T_1 - Muster nach Säulenchromatographie an DEAE - Zellulose auftauchten, sollte es sich um Trinukleotide handeln.

Die Ribonuklease T_2 - Spaltung mit anschließender zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie in den Laufmitteln D und E lieferte zwei Produkte, nämlich Cp und Gp. Es könnte also u. a. die Sequenz CCG vorliegen. Die quantitative Auswertung sprach jedoch klar dagegen; Cp und Gp standen im Verhältnis 1 : 1 zueinander. Dies sprach für eine Sequenz CG. Nach dem Elutionsmuster der "Tener"- Säule ist dies aber nicht zu vertreten.

Eine andere Alternative wäre die Anwesenheit von Dihydrouridin. Dieses Nukleosid ist im UV - Licht bei 254 nm nicht identifizierbar, da bei dieser Wellenlänge keine Adsorption

zu beobachten ist.

Nach Behandlung von T_1 5 mit alkalischer Phosphatase und Reinigung durch Dünnschichtchromatographie in Laufmittel C wurde das Oligonukleotid mit Schlangengiftphosphodiesterase behandelt. Bei der dünnschichtchromatographischen Trennung in Laufmittel C konnten pC und pG zweifelsfrei zugeordnet werden. Das erwartete 5'- terminale Nukleosid wurde im UV - Licht bei 254 nm nicht entdeckt. Wegen der Vermutung, daß es sich um Dihydrouridin handeln könnte, wurde der Bereich isoliert, dessen R_f - Wert demjenigen von Dihydrouridin entsprach (Dihydrouridin besitzt annähernd gleiche Mobilität wie Uridin). Das eluierte Material wurde der Alkaliprobe unterworfen, wobei das Pyrimidinsystem im Alkalischen unter Verlust des Sechsrings ein β - Ureidopropionsäurederivat bildet (33,34). Die damit verbundene Zu- bzw. Abnahme der Extinktion bei 235 nm ist eindeutig meßbar. Die Reaktion macht sich durch einen spontanen Adsorptionszuwachs nach Alkalizugabe und anschließendes langsames, konstantes Absinken der optischen Dichte bemerkbar. Dieser Test verlief zweifelsfrei positiv.

Somit resultierte aus diesen Untersuchungen für das Oligonukleotid T_1 5 die Sequenz DCG.

3.4.2.6. Nukleotidsequenz von T₁ 6 (DAGp)

Nach einer Spaltung von T₁ 6 mit Ribonuklease T₂ konnten nur Ap und Gp erkannt werden.

Um weitere Informationen zu erhalten, wurde eine kombinierte Spaltung mit Ribonuklease A und alkalischer Phosphatase ausgeführt. Nach Dünnschichtchromatographie in Laufmittel C war nur eine Bande erkennbar, die mit dem Dinukleosidmonophosphat ApG einen identischen R_f - Wert aufwies. Die daraufhin ausgeführte Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase und anschließender Dünnschichtchromatographie in Laufmittel B brachte das eindeutige Ergebnis A und pG. Die UV - Spektren bei pH 1, pH 7 und pH 13 sowie die quantitative Auswertung bestätigten diesen Befund. Damit war das 3'- Ende dieses Oligonukleotids zu AG geklärt. Die Vermutung, daß es sich wieder um ein Trinukleotid handelt, das am 5'- terminalen Ende ein Dihydrouridin trägt, ließ sich mit der Alkaliprobe erneut bestätigen. Die daraus abgeleitete Sequenz für T₁ 6 war demnach mit DAG anzugeben.

3.4.2.7. Identität von T₁ 7 (pGp)

Die UV - Spektren dieses Bereichs optischer Dichte glichen denen von authentischem Gp. Daraufhin ausgeführte Dünnschichtchromatographien in den Laufmitteln A, B und C besaßen jedoch von Gp abweichende R_f - Werte, die aber nach Behand-

lung mit alkalischer Phosphatase mit denen von Guanosin übereinstimmen. Diese Informationen sprachen für die Anwesenheit von pGp in T_1 7. Dünnschichtchromatographie in Laufmittel C nach der Methode der Mischtechnik (siehe 5.2.7.) bewies diesen Sachverhalt eindeutig. Die Identität von T_1 7 entsprach also pGp.

Die Position dieses Fragments in $tRNA_3^{Lys}$ läßt sich in Übereinstimmung mit den bisher sequenzierten Transfer- RNAs auf das 5'- Ende festlegen.

3.4.2.8. Nukleotidsequenz von T_1 8 (UUCG)

Reinigung von T_1 8 durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase und Dünnschichtchromatographie in Laufmittel C lieferte eine intensive Bande.

Nach Elution wurde ein Aliquot dieses Oligonukleotids mit Schlangengiftphosphodiesterase gespalten und die Reaktionsprodukte dünnschichtchromatographisch in Laufmittel C getrennt. Es resultierten vier Bereiche mit optischer Dichte, die mit Hilfe von authentischen Nukleosiden und Nukleotiden durch ihre R_f - Werte vorläufig zugeordnet werden konnten. Als Nukleosid war Uridin entstanden, das somit die 5'- terminale Position dieses Oligonukleotids einzunehmen hatte. Daneben waren im UV- Licht bei 254 nm die 5'- Mononukleotide pU, pC und pG sichtbar. Nach Elution des

Materials wurden UV- Spektren bei pH 1, pH 7 und pH 13 angefertigt, die diesen Befund eindeutig bestätigten; ebenso stützte die quantitative Auswertung ($U : pU : pC : pG = 1 : 0,96 : 1,03 : 1,16$) das Vorliegen von U, pU, pC und pG.

Somit ergaben sich aus diesem Versuch die folgenden Sequenzalternativen:

(a) UCUG

(b) UUCG

Mit einfachen Methoden lassen sich diese beiden Sequenzen nicht unterscheiden. Es bietet sich jedoch eine Methode von P.T. Gilham (35,36) an:

N- cyclo- hexyl N'- β - 4-[methylmorpholinium]-äthylcarbo- diimid- p -toluolsulfonat (CMCT) reagiert unter geeigneten

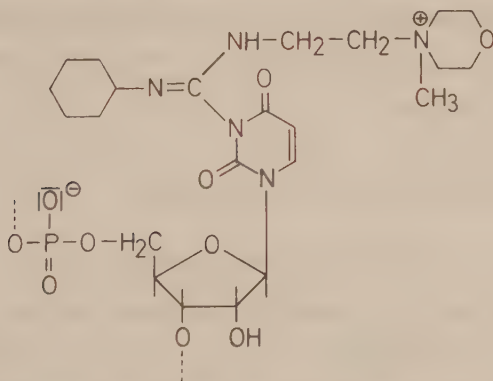


Abb. 7: Reaktionsprodukt von Uridin mit CMCT

Bedingungen nur mit Uridinen (Abbildung 7) und in geringerem Ausmaß mit Guanosin. Wird diese Reaktion an einem beliebigen

T₁- Oligonukleotid ausgeführt, so kann Ribonuklease A nur noch nach Cytidinen, jedoch nicht mehr nach den modifizierten Uridinen angreifen.

Nach Umsetzung mit diesem Reagens wurde T₁ 8 mit Ribonuklease A und alkalischer Phosphatase behandelt. Trennung und Reinigung der Reaktionsprodukte erfolgte durch Dünnschichtchromatographie in Laufmittel C. Nach Isolierung des CMCT- modifizierten Oligonukleotids wurde dieses in einer vierstündigen Inkubation mit 0,2 M Triäthylamin behandelt um das CMCT wieder abzuspalten. Die Zusammensetzung dieses Fragments konnte durch Behandlung mit Schlangengiftphosphodiesterase geklärt werden. Die Reaktionsprodukte U, pU und pC zeigten, daß die mit (b) bezeichnete Alternative UUCG richtig war.

Wäre der Sequenzvorschlag unter (a) der gesuchte gewesen, dann hätte man zwei modifizierte Oligonukleotide, nämlich UC und UG finden müssen.

3.4.2.9. Nukleotidsequenz von T₁ 9 (CCCCG)

Dieser Gipfel der optischen Dichte brachte keine Probleme. Nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase und Reinigung durch Dünnschichtchromatographie in Laufmittel C wurde eine Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase ausgeführt. Die R_f- Werte und UV- Spektren bei pH 1, pH 7 und pH 13 sprachen für C, pC und pG. Die quantitative Auswertung der molaren

Verhältnisse zeigte: C : pC : pG = 1 : 2,07 : 1,1. Mit diesen Informationen war die Sequenz von T₁ 9 mit CCCC gesichert.

3.4.2.10. Nukleotidsequenz von T₁ 10 (Tm¹VCam¹AG)

Wie schon unter 3.4.1. ausgeführt, konnte bei Routineuntersuchungen in tRNA₃^{Lys} kein Ribothymidin gefunden werden; dagegen wurde ein neuer Fleck im UV- Licht bei 254 nm identifiziert, der vorläufig mit U*_p bezeichnet wurde (vgl. Abbildung 6). Dieser Fleck konnte nach Spaltung mit Ribonuklease T₂ und anschließender zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie in den Laufmitteln D und E lokalisiert werden. Um sicherzustellen, daß es sich nicht um Up handelt, das ähnliche R_f- Werte aufweist, wurde in einem Kontrollversuch vor der ersten Dimension authentisches Up im Start mitaufgetragen. Die Abbildung 8 beweist, daß in T₁ 10 tatsächlich U*_p vorliegt.

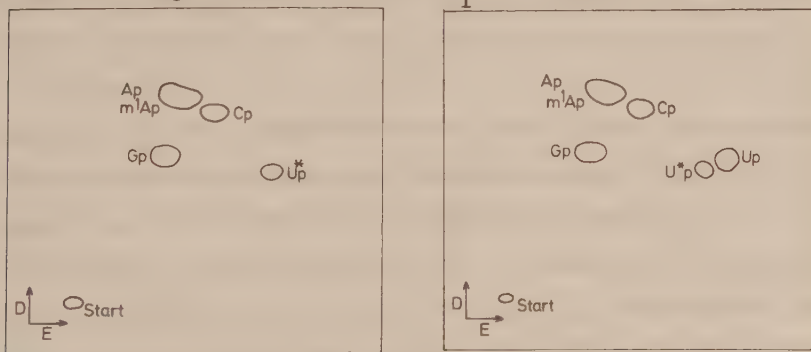


Abb. 8: Spaltung von T₁ 10 mit Ribonuklease T₂ und zweidimensionale Dünnschichtchromatographie in den Laufmitteln D und E; links ohne und rechts mit Zugabe von authentischem Up.

Das durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase und anschließender Dünnschichtchromatographie in Laufmittel C gewonnene Oligonukleotid wurde einer kombinierten Spaltung mit Ribonuklease A und alkalischer Phosphatase unterzogen. Die entsprechende Dünnschichtchromatographie in Laufmittel A lieferte drei Banden, wovon eine einen identischen R_f -Wert mit authentischem C aufwies; UV-Spektren ließen daran keinen Zweifel. Es wurden neben C noch Tm^W und Am^1AG erhalten, deren Zusammensetzung wie folgt bewiesen wurde:

3.4.2.10.1. Das Fragment Am^1AG

Die Lage der Bande, sowie die auftretende Fluoreszenz nach Behandlung mit Salzsäuredampf ließ annehmen, daß es sich um das 3'-Ende des Oligonukleotids handelte; die Guanosinfluoreszenz war deutlich zu erkennen. Eine Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase zeigte eindeutig die Anwesenheit von pG; dies ließ sich durch UV-Spektren belegen. Daneben entstanden weitere Banden, deren Charakterisierung für das Vorliegen von Apm^1A und als Nebenprodukt dessen Umlagerungsprodukt Apm^6A . Die Hemmung von Schlangengiftphosphodiesterase durch m^1A und m^6A ist bekannt. Eine Spaltung von Apm^1A und Apm^6A mit Ribonuklease T_2 lieferte schließlich Ap, m^1A und m^6A , wodurch die Sequenz Am^1AG gesichert war.

m^6A entsteht dabei durch eine Umlagerungsreaktion aus m^1A durch Ringöffnung, Rotation und Recyclisierung wie die Abbil-

dung 9 zeigt:

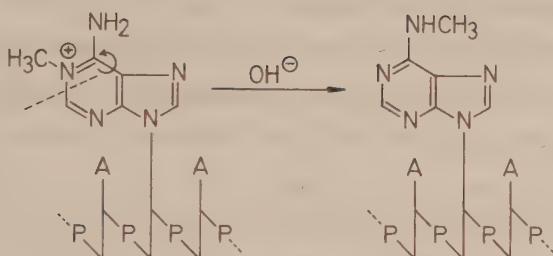


Abb. 9: Dimroth- Umlagerung unter Öffnung des Sechsringes, Rotation um eine C—C- Achse und Recyclisierung (37 - 39).

3.4.2.10.2. Identifizierung von Tm ψ

UV- Spektren dieses Dinukleosidmonophosphats zeigten im Alkalischen eine charakteristische bathochrome Verschiebung, welche implizierte, daß es sich bei einer der beiden Komponenten um ein Pseudouridin handeln könnte (Abbildung 10).

Versuche mit den Ribonukleasen T₂ und A zeigten, daß dieses Dinukleosidmonophosphat gegen diese Nukleasen resistent ist. Nach vergeblichen Experimenten führte eine Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase unter sehr scharfen Bedingungen (10- facher Enzymüberschuß und 24stündige Inkubation bei 37°C) zu einer Zerlegung in zwei Komponenten. Selbst unter diesen drastischen Bedingungen konnte nur eine ca. 50%ige Spaltung nachgewiesen werden. Die Reaktionsprodukte wurden isoliert und weiter analysiert.

Nach Vorreinigung konnte $p\psi$ als 5'- Mononukleotid eindeutig identifiziert werden. Dazu waren Dünnschichtchromatographien in den Laufmitteln A, B und C mit authentischem Material, die oben genannte Mischtechnik in denselben Fließmitteln sowie UV- Spektren bei pH 1, pH 7 und pH 13 nötig.

Die Identifizierung des unbekannten Nukleosids U^* erwies sich als ungleich schwieriger. Die extreme Widerstandsfähigkeit des Dinukleosidmonophosphats gegen enzymatische Angriffe, die UV- Spektren sowie die hohe Mobilität in der Dünnschichtchromatographie führte zu der Überzeugung, daß es sich um ein Ribothymidinderivat handeln könnte. Wie die Abbildung 10 zeigt, waren die UV- Spektren praktisch mit denen von Ribothymidin identisch.

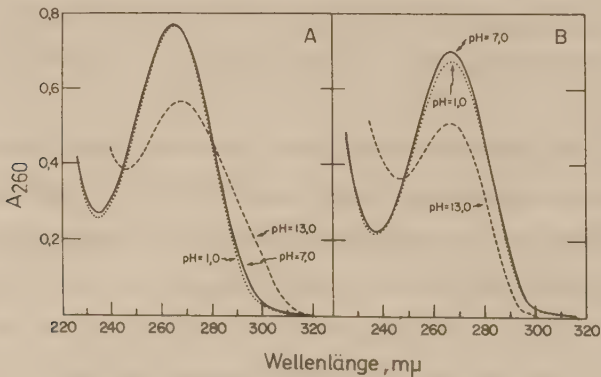


Abb. 10: UV- Spektren von $Tm\psi$ (A) und Tm (B) bei pH 1, pH 7 und pH 13.

Die R_f -Werte aus verschiedenen Dünnschichtchromatographien sprachen jedoch klar gegen Ribothymidin. Es mußte daher eine Modifizierung der Ribose in Betracht gezogen werden, wobei eine Methylierung primär in Frage käme. Aus den vorliegenden Informationen wurde geschlossen, daß es sich bei dem unbekannten Nukleosid um 2'-Methylribothymidin handeln könnte. Um dies zu beweisen, war es notwendig, authentisches Material zu synthetisieren. Im hiesigen Laboratorium wurde daher 2'-Methylribothymidin durch Umsetzung von Ribothymidin mit Dibutylzinnoxid und anschließender Spaltung des Adduktes mit Methyljodid in Analogie zu einer Vorschrift von D. Wagner et al. dargestellt (40). Die Abbildung 11 zeigt den Reaktionsverlauf:

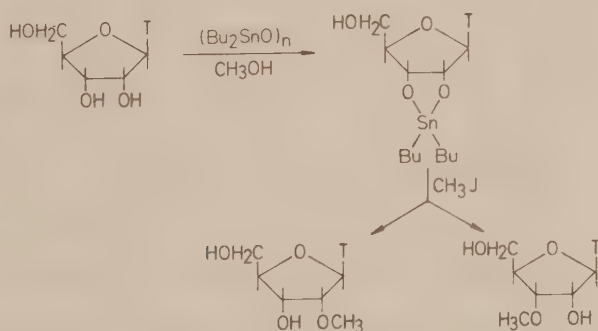


Abb. 11: Synthese von 2'-Methylribothymidin aus Ribothymidin und Dibutylzinnoxid; die Spaltung des Addukts erfolgte mit Methyljodid.

Mit dem erhaltenen Material konnte die Identität zwischen U* und synthetischem 2'-O- Methylribothymidin (Abbildung 12) überzeugend bewiesen werden (41). Neben UV- Spektren wurde sowohl

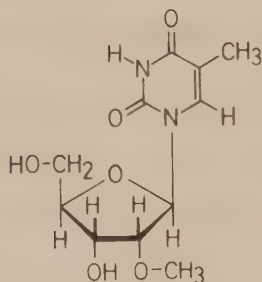


Abb. 12: Formelbild von 2'-O- Methylribothymidin

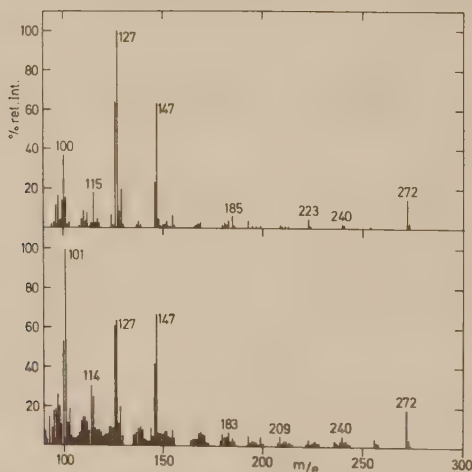


Abb. 13: Massenspektren von U* aus Kaninchenleber - tRNA^{Lys}₃ (oben) und synthetischem 2'-(3')-O- Methylribothymidin (unten).

vom authentischen als auch synthetisch erhaltenen Material jeweils ein Massenspektrum angefertigt, deren Vergleich zufriedenstellend ausfiel.

Somit war die Teilsequenz Tm ψ bewiesen; dabei ist für Tm 2'O- Methylribothymidin zu setzen.

3.4.2.10.3. Zusammenstellung der Oligonukleotidsequenz von T₁ 10

Wie unter 3.4.2.10. erwähnt, konnte nach kombinierter Spaltung mit Ribonuklease A und alkalischer Phosphatase reines Cytidin isoliert werden; die Stellung innerhalb des Oligonukleotids blieb aber unbekannt. Berücksichtigte man alle bisherigen Ergebnisse, so blieben nur noch zwei Sequenzalternativen:

(a) C Tm ψ Am¹AG

(b) Tm ψ C Am¹AG

Steht C am 5'- terminalen Ende, so müßte nach Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase des Oligonukleotids T₁ 10 Cytidin entstehen; im Falle (b) sollte pC erhalten werden. Der entsprechende Versuch sprach dann eindeutig für den Sequenzvorschlag unter (b): es wurde nur pC erhalten. Eine abschließende quantitative Betrachtung der molaren Verhältnisse bestätigte schließlich, daß die Sequenz Tm ψ CAm¹AG korrekt ist (nur 1C zwischen Tm ψ und Am¹AG).

3.4.2.11. Nukleotidsequenz von T₁ 11 (AUAm²G)

Eine kombinierte Spaltung von T₁ 11 mit Ribonuklease A und alkalischer Phosphatase lieferte nach Dünnschichtchromatographie in Laufmittel C zwei Banden (AU und Am²G). Beide Dinukleotide wurden mit Schlangengiftphosphodiesterase behandelt und die Reaktionsprodukte dünnschichtchromatographisch in Laufmittel B analysiert. Die R_f-Werte und danach angefertigte UV-Spektren ergaben die Zusammensetzungen AU und AG*. Die für G* in Frage kommenden seltenen Nukleoside konnten schließlich mittels Dünnschichtchromatographien und UV-Spektren auf m²G und m²G eingegrenzt werden. Unter Anwendung der Mischtechnik in den Laufmitteln A, B und C konnte zweifelsfrei festgestellt werden, daß es sich um N²-Monomethylguanosin (m²G) handelte.

Interpretation der vorliegenden Ergebnisse und Einbeziehung der molaren Verhältnisse der einzelnen Komponenten (A : U : m²G = 2,08 : 1,0 : 1,07) ergaben für T₁ 11 die Sequenz AUAm²G.

3.4.2.12. Nukleotidsequenz von T₁ 12 (CUCAG)

Dieses Material wurde durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase und anschließender Dünnschichtchromatographie in Laufmittel C gereinigt; dabei erwies sich T₁ 12 als homogen.

Spaltung des Oligonukleotids mit Schlangengiftphosphodiesterase

und Dünnschichtchromatographie in Laufmittel C ergab fünf Produkte. Neben dem 5'- terminalen Nukleosid C zeigten die R_F - Werte die Anwesenheit der 5'- Mononukleotide pU, pC, pA und pG an ($C : U : A : G = 2,04 : 1,0 : 1,05 : 1,0$).

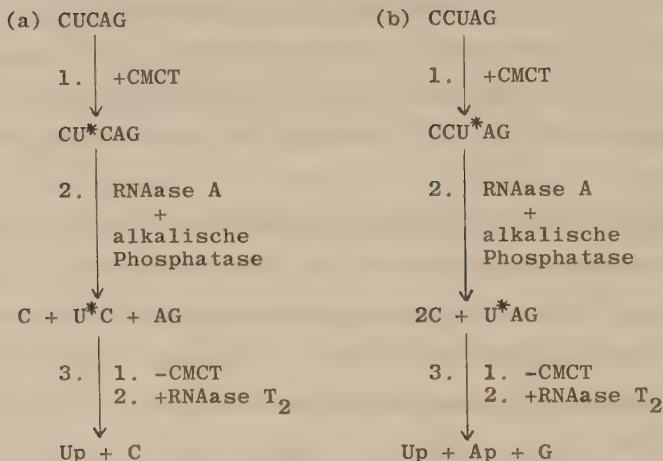
Nach Spaltung von T_1 12 mit Ribonuklease A und alkalischer Phosphatase konnte man auf der Dünnschichtplatte (Laufmittel C) neben etwas Ausgangsmaterial zwei Spaltprodukte isolieren. Eine Spaltung mit Ribonuklease T_2 und die Aufnahme der entsprechenden UV- Spektren bewiesen die Sequenz AG für eines der Spaltstücke. Das andere Spaltprodukt erwies sich als ein Gemisch der Nukleoside C und U im Molverhältnis 2 : 1. Eine quantitative Analyse der molaren Verhältnisse des Oligonukleotids T_1 12 brachte das Ergebnis: $(2C+1U) : 1AG = 1 : 1$.

Als Sequenzalternativen für T_1 12 kamen somit in Frage:

(a) CUCAG

(b) CCUAG

Auch hier versagten die herkömmlichen normalen Methoden zur Unterscheidung der möglichen Sequenzen; eine chemische Modifizierung des Uridins mit CMCT sollte eine der beiden alternativen Sequenzen ausschließen. Für die Vorschläge (a) und (b) würden sich nach der Behandlung mit diesem Reagens und einer weiteren Charakterisierung mit Ribonuklease A, alkalischer Phosphatase und Ribonuklease T_2 folgende Reaktionsverläufe ergeben:



Der Versuch zeigte, daß im zweiten Schritt ApG entstanden war, welches durch Spaltung mit Ribonuklease T₂ und nachfolgender Dünnschichtchromatographie in Laufmittel C identifiziert wurde. Der letzte Schritt brachte als Ergebnis Up + C. Damit war nach obigem Schema der Sequenzvorschlag unter (a) mit CUCAG bewiesen.

3.4.2.13. Nukleotidsequenz von T₁ 13 (m⁷GDm⁵Cm⁵CAG)

Die Spaltung dieses Oligonukleotids mit Ribonuklease T₂ und anschließende zweidimensionale Dünnschichtchromatographie in den Laufmitteln D und E zeigte, daß in T₁ 13 neben normalem Guanotin ein weiteres Guanosinderivat (m⁷G) enthalten war.

Eine Behandlung von T₁ 13 mit Schlangengiftphosphodiesterase und Dünnschichtchromatographie in Laufmittel C lieferte als

5'- terminales Nukleosid m^7G sowie die 5'- Mononukleotide pA, pC, pm^5C und pG.

Bei einer kombinierten Spaltung mit Ribonuklease A und alkalischer Phosphatase konnten mittels Dünnschichtchromatographie in Laufmittel C und UV- Spektroskopie identifiziert werden: ApG, m^5C , C und m^7GpD . Die Existenz von Dihydrouridin im Dinukleosidmonophosphat m^7GpD konnte durch die Alkali- probe (33,34) eindeutig positiv nachgewiesen werden.

ApG wurde durch Spaltung mit Ribonuklease T_2 und anschließender Dünnschichtchromatographie in Laufmittel C sowie den entsprechenden UV- Spektren als 3'- Terminus des Oligonukleotids T_1 13 identifiziert.

Die Teilsequenz m^7GpD ist am 5'- Ende des Oligonukleotids lokalisiert, da nach der oben beschriebenen Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase m^7G als Nukleosid entstanden war. Dihydrouridin (D) wurde durch Spaltung des m^7GpD mit Ribonuklease T_2 und dünnschichtchromatographische Trennung von m^7Gp und D mit der Alkaliprobe nachgewiesen (33,34).

m^5C und C mußten daher zwischen den Partialsequenzen m^7GpD und ApG lokalisiert sein. Eine quantitative Auswertung ergab 65,3% m^5C und 34,7% C. Diese Werte zeigten, daß in der Sequenz zwei m^5C vorlagen, die Methylierung aber nicht vollständig war. Mit diese Daten konnte man die Sequenz von T_1 13 aufstellen; sie lautete demnach: $m^7GDm^5Cm^5CAG$.

3.4.2.14. Nukleotidsequenz von T₁ 14 (UCCCUG)

Die Abspaltung des endständigen 3'- Phosphats durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase und anschließende Dünnschichtchromatographie in Laufmittel C zeigte Homogenität von T₁ 14.

Eine Spaltung mit Ribonuklease T₂ lieferte 3'- Mononukleotide. Geeignetes authentisches Material bei der Dünnschichtchromatographie in Laufmittel C sowie UV- Spektren bei pH 1. pH 7 und pH 13 brachten als Ergebnis Up, Cp und Gp. Die quantitative Auswertung der molaren Verhältnisse ergab: Up : Cp : Gp = 1,85 : 3,08 : 1. Um die Anzahl der Sequenzalternativen einzuschränken wurde eine Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase ausgeführt die als 5'- terminales Nukleosid U ergab. Unter Einbeziehung dieser Kenntnis blieben für T₁ 14 folgende Sequenzanordnungsmöglichkeiten:

- (a) UUCCCG
- (b) UCUCCG
- (c) UCCUCG
- (d) UCCCUG

Betrachtet man diese Sequenzen, erkennt man, daß die sonst sehr hilfreiche Spaltung mit Ribonuklease A und alkalischer Phosphatase keine verwertbaren Informationen bringen würde, da neben dem 3'- terminalen Guanosin in der Sequenz nur Pyrimidine enthalten sind; die chemische Modifizierung des Oligonukleotids sollte jedoch ein eindeutiges Ergebnis bringen.

Nach Behandlung dieses T₁- Fragments mit CMCT und Dünnschicht-

chromatographie in Laufmittel C konnten neben unverbrauchtem CMCT zwei Reaktionsprodukte isoliert werden. Die eine Bande enthielt ein Fragment in dem nur ein Uridin reagiert hatte, während der am weitesten gelaufene Bereich das erwartete modifizierte Oligonukleotid enthalten sollte. Dieses modifizierte Oligonukleotid wurde isoliert und mit Ribonuklease A sowie alkalischer Phosphatase inkubiert. Die entstandenen Reaktionsprodukte wurden dünn-schichtchromatographisch in Laufmittel C getrennt; dabei wurden vier Bereiche mit optischer Dichte identifiziert (U^*pC , U^*pG , U^*pG^*). Das entstandene Nukleosid wurde durch seinen R_f -Wert und UV-Spektren bei pH 1, pH 7 und pH 13 eindeutig als C charakterisiert. U^*pC , U^*pG und U^*pG^* , wurden mit 0,2 M Triäthylamin inkubiert um das CMCT wieder zu entfernen. Danach wurden die Dinukleosidmonophosphate mit Ribonuklease T_2 gespalten und dünn-schichtchromatographisch in Laufmittel C getrennt. Die erhaltenen R_f -Werte wurden mit denen von authentischem Material verglichen. Die Ergebnisse dieser Experimente bestätigten eindeutig die Teilsequenzen UpC und UpG.

Interessant war die Anwesenheit von U^*pG^* neben U^*pG . Die Tatsache, wonach neben Uridinen auch Guanosine mit CMCT modifiziert werden können, stimmt mit den Ergebnissen von P. T. Gilham (35,36) überein, der analoges Verhalten beobachtete.

Zur Aufstellung der Oligonukleotidsequenz von T_1 14 standen demnach folgende Informationen zur Verfügung: UpC, UpG und

zwei C. Früher war durch Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase gezeigt worden, daß der 5'-Terminus von Uridin eingenommen wird. Von den Teilsequenzen kam dafür nur UpC in Frage. Da ein Oligonukleotid vorlag, das nach Behandlung von $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ mit Ribonuklease T_1 entstanden war, mußte UpG am 3'-Ende lokalisiert sein; damit blieben für die beiden Cytidine nur die Mittelpositionen übrig. Die aus den vorliegenden Daten zusammensetzbare Sequenz von T_1 14 entsprach dem Sequenzvorschlag (d) und war mit UCCCUG anzugeben.

3.4.2.15. Nukleotidsequenz von T_1 15 (CA Ψ CAG)

Nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase und Dünnschichtchromatographie in Laufmittel C wurde ein zweitesmal in Laufmittel F gereinigt.

Eine kombinierte Spaltung mit Ribonuklease A und alkalischer Phosphatase lieferte nach dünnschichtchromatographischer Trennung in Laufmittel C drei Produkte, C, Ap Ψ und ApG im Molverhältnis C : Ap Ψ : ApG = 2 : 0,85 : 1,1.

ApG konnte durch Vergleich mit authentischem Material auf der Dünnschichtplatte und durch UV-Spektren identifiziert werden. Eine Spaltung mit Ribonuklease T_2 bestätigte dieses Ergebnis.

C wurde in mehreren Laufmitteln der Dünnschichtchromatographie durch identische R_f -Werte mit authentischem Cytidin be-

stimmt; UV- Spektren bei pH 1, pH 7 und pH 13 erhärteten diesen Befund.

Das Dinukleosidmonophosphat $Ap\psi$ wurde durch Spaltung mit Ribonuklease T_2 unter Heranziehung der R_f - Werte nach Dünnschichtchromatographien in den Laufmitteln A, B und C sowie der entsprechenden UV- Spektren eindeutig charakterisiert.

Mit den erarbeiteten Informationen, einschließlich der quantitativen Analyse, bestanden bezüglich der Nukleotidsequenz mehrere Alternativen:

- (a) $CCA\psi AG$
- (b) $CA\psi CAG$
- (c) $A\psi CCAG$

Die Beobachtung, daß die Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase bei Anwesenheit modifizierter Basen erschwert ist, half bei der Aufstellung der Nukleotidsequenz weiter.

Die Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase und die Dünnschichtchromatographie der Reaktionsprodukte in Laufmittel C ergab sechs Bereiche mit optischer Dichte, die durch Vergleich der R_f - Werte mit authentischem Material und UV- Spektren bis auf eine Ausnahme eindeutig charakterisiert werden konnten.

Die Spaltprodukte sowie ihre Zuordnung sind in der folgenden Tabelle (Tabelle 1) wiedergegeben:

Bezeichnung des Spaltproduktes	Charakterisierung
Bereich optischer Dichte (1)	p Ψ
Bereich optischer Dichte (2)	pG
Bereich optischer Dichte (3)	CA Ψ oder CCA Ψ
Bereich optischer Dichte (4)	pC
Bereich optischer Dichte (5)	pA
Bereich optischer Dichte (6)	C

Tabelle 1: Reaktionsprodukte aus der Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase von T₁ 15 (CA Ψ CAG).

Aus den Spaltprodukten in Tabelle 1 ist zu erkennen, daß die Schlangengiftphosphodiesterase unter den angewendeten Bedingungen bei Pseudouridin (Ψ) partiell gehemmt ist. Das entstandene C mußte in der Sequenz am 5'- Ende lokalisiert sein; eine Kontrollspaltung unter härteren Bedingungen bestätigte dies. Mit diesem Ergebnis konnte man den Vorschlag (c) ausschließen.

Eine vollständige Spaltung des Bereichs optischer Dichte (3) aus Tabelle 1 sollte die korrekte Sequenz liefern. Lag CA Ψ vor, so müßte nach Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase C + pA + p Ψ entstehen; im anderen Falle, CCA Ψ , sollte C + pC + pA + p Ψ zu finden sein. Das entsprechende Experiment ergab nur C + pA + p Ψ . Damit stand die Sequenz von T₁ 15 mit CA Ψ CAG fest.

3.4.2.16. Nukleotidsequenz von T₁ 16 (ACUSUUXA Ψ CUG)

Dieses Oligonukleotid wurde als letztes von der "Tener"-Säule eluiert. Die Stellung im T₁-Muster deutete auf eine Kettenlänge von ca. 12 - 14 Nukleotiden hin.

Da ein Oligonukleotid dieser Kettenlänge bei der Dünnschichtchromatographie keine Mobilität mehr besitzt, wurde es nach Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase über eine kleine DEAE-Säule gereinigt.

Eine Spaltung mit Ribonuklease A und alkalischer Phosphatase mit anschließender Dünnschichtchromatographie in Laufmittel C ergab fünf deutlich voneinander getrennte Bereiche mit optischer Dichte. R_f-Werte und UV-Spektren brachten die ersten Anhaltspunkte für die Zusammensetzung der einzelnen Spaltprodukte (AC, C, U, XA Ψ , SU, G).

3.4.2.16.1. Die Teilsequenz XA Ψ

Dieses Ribonuklease A - Fragment von T₁ 16 zeichnete sich neben seiner extrem hellblauen Fluoreszenz bei 254 nm durch ein sehr charakteristisches UV-Spektrum aus. Eine Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase lieferte drei Reaktionsprodukte; zwei 5'-Mononukleotide, pA und p Ψ , die durch R_f-Werte und UV-Spektroskopie eindeutig zuzuordnen waren sowie ein unbekanntes Nukleosid X. Damit war die Partialsequenz zu XA Ψ gesichert.

Das Nukleosid X besaß dieselbe Fluoreszenz wie das Ausgangsmaterial; es wurde dünn-schichtchromatographisch in den Laufmitteln A, B und C charakterisiert. Die Aufnahme von UV-Spektren bewies, daß die Komponente X für das eigenartige UV-Spektrum von XA Ψ verantwortlich war. Wie die Abbildung 14 zeigt, liegen im sauren und neutralen pH-Bereich jeweils

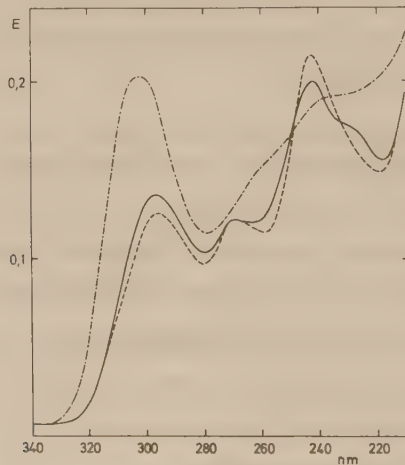


Abb. 14: UV- Spektren des unbekannten Nukleosids X bei pH 1 (----), pH 7 (—) und pH 13 (-.-.-).

drei Maxima vor, während bei pH 13 eine deutliche Änderung im spektroskopischen Verhalten zu verzeichnen ist.

Die Sensitivität gegen Ribonuklease U₂ (s.u.) ließ die Folgerung zu, daß es sich bei X um ein Purinderivat handelt. Versuche von K. Limburg (28), die Struktur von X aufzuklären,

blieben bisher ohne endgültiges Ergebnis.

3.4.2.16.2. Die Teilsequenz SU

Die Spaltung dieses Fragments mit Schlangengiftphosphodiesterase, der Mobilität nach ein Dinukleosidmonophosphat, lieferte nach Dünnschichtchromatographie in Laufmittel C zwei Reaktionsprodukte, pU (nach R_f -Wert und UV-Spektren identisch mit authentischem pU) und ein Nukleosid S, vermutlich ein Derivat des 2-Thiouridins. Dünnschichtchromatographien mit mehreren Thiouridinderivaten in verschiedenen Laufmitteln (A, B, C) nach der Methode der Mischtechnik und Diskussion der UV-Spektren (Abbildung 15) führten zu dem

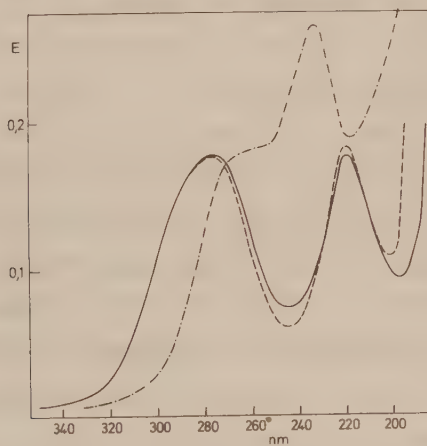


Abb. 15: UV- Spektren des seltenen Nukleosids S bei pH 1 (-----), pH 7 (——) und pH 13 (-·-·-·-).

Ergebnis, daß es sich um den 2-Thio-5-carboxymethyluridin-

methylester (S) handelte (28). Somit konnte die Partialsequenz SU als gesichert angesehen werden.

3.4.2.16.3. Identifizierung von U und G

Nach Spaltung von T_1 16 mit Ribonuklease A und alkalischer Phosphatase wurde nach der entsprechenden Dünnschichtchromatographie in Laufmittel C ein Bereich gefunden, dessen R_f -Wert und die UV-Spektren ein Gemisch aus U und G vermuten ließen. Eine daraufhin ausgeführte Dünnschichtchromatographie mit dem fraglichen Material in Laufmittel A führte zur Separierung von zwei Nukleosiden, deren Mobilität und spektroskopisches Verhalten ohne Zweifel für U und G im Molverhältnis $U : G = 2,9 : 1$ sprachen.

3.4.2.16.4. Die Teilsequenz AC

Die Lage dieses Bereichs optischer Dichte auf der Dünnschichtplatte sprach für das Dinukleosidmonophosphat ApC. Wie erwartet bestätigten die R_f -Werte und UV-Spektren nach Spaltung mit Ribonuklease T_2 und anschließender Dünnschichtchromatographie in Laufmittel B diese Annahme. Die quantitative Auswertung ergab: $Ap : C = 1,08 : 1$; damit war die Teilsequenz AC bewiesen.

3.4.2.16.5. Identifizierung von C

R_f -Werte nach verschiedenen Laufmitteln (A, B, C) und UV-

Spektren bei pH 1, pH 7 und pH 13 belegten eindeutig, daß es sich um reines Cytidin handelte.

3.4.2.16.6. Experimente zur Ableitung der Sequenz von
ACUSUUXA Ψ CUG

Ribonuklease U_2 aus *Ustilago spaerogena* ist purinspezifisch. Bei T_1 - Fragmenten sollte deshalb nur nach Adenosinen gespalten werden.

T_1 16 wurde mit Ribonuklease U_2 und alkalischer Phosphatase behandelt. Die entsprechende Dünnschichtchromatographie in Laufmittel C lieferte vier Reaktionsprodukte. Der oberste Bereich optischer Dichte war identisch mit Adenosin-2',3'-cyclophosphat, das durch Nachbehandlung mit Ribonuklease T_2 unter Ringöffnung in Adenosin-3'-phosphat übergeführt werden konnte. Das Reaktionsprodukt mit der geringsten Mobilität war ungespaltenes Ausgangsmaterial; die beiden anderen Bereiche mit optischer Dichte wurden isoliert und auf ihre Zusammensetzung hin überprüft (CUSUUX und Ψ CUG).

Durch Spaltung von CUSUUX mit Schlangengiftphosphodiesterase und Trennung der Reaktionsprodukte auf einer Dünnschichtplatte in Laufmittel C konnte gezeigt werden, daß am 5'-Ende dieses Oligonukleotids ein Cytidin lokalisiert war. Erstaunlicherweise konnte kein pA gefunden werden. Da neben pX nur Pyrimidine gefunden wurden, war dieser Sachverhalt nur so zu erklären, daß das oben erwähnte Nukleosid X ein

Purinderivat darstellt. Außerdem konnten identifiziert werden: pU und pS. Die Ergebnisse aus 3.4.2.16.2 und 3.4.2.16.3 bezüglich ihrer molaren Verhältnisse forderten für T₁16 vier Uridine. Wie später gezeigt wird, enthält das Fragment Ψ CUG nur ein Uridin. Da außer Adenosin-2',3'-cyclophosphat nach Spaltung mit Ribonuklease U₂ neben Ψ CUG nur noch CUSUUX entstanden war, mußten in diesem Oligonukleotid drei Uridine enthalten sein. Berücksichtigt man die Zusammensetzung des Dinukleosimonophosphats SpU aus 3.4.2.16.2, so ergeben sich als Sequenzalternativen:

(a) CUSUUX

(b) CSUUUX

(c) CUUSUX

Zuerst wurde versucht, dieses Oligonukleotid mit Polynukleotidphosphorylase abzubauen; dabei würde als Spaltprodukt das 5'- terminale Trinukleosiddiphosphat entstehen. Die Ergebnisse dieser Experimente waren allerdings wenig überzeugend. Das erwartete Trinukleosiddiphosphat konnte trotz mehrerer Reinigungsschritte nicht isoliert und charakterisiert werden. Es zeigte sich, daß die [³²P]-Markierung mit γ -[³²P]-ATP am 5'- Ende des Fragments mit anschließender Schlangengiftphosphodiesterasebehandlung die besseren Ergebnisse lieferte.

Nach Darstellung von γ -[³²P]-ATP nach der Methode von Glynn und Chappel (42) wurden jeweils ein Aliquot von CUCUUX und CUCAG am 5'- Ende mittels γ -[³²P]-ATP und Polynukleotid-

kinase aus T_4 - infizierten E. coli - Zellen (43-47) phosphoryliert.

Nach der $5' [^{32}P]$ - Markierung wurden beide Oligonukleotide durch eindimensionale Hochspannungselektrophorese in 7% HCOOH auf Whatman DE81- Papier gereinigt. Der schrittweise Abbau von $^{32}pCUSUUX$ und $^{32}pCUCAG$ müßte für die in Tabelle 2 aufgeführten Fragmente Radioaktivitätsmaxima liefern.

$^{32}pCUCAG$	$^{32}pCUSUUX$	$^{32}pCSUUUX$	$^{32}pCUUSUX$
$^{32}pCUCAG$	$^{32}pCUSUUX$	$^{32}pCSUUUX$	$^{32}pCUUSUX$
$^{32}pCUCA$	$^{32}pCUSUU$	$^{32}pCSUUU$	$^{32}pCUUSU$
$^{32}pCUC$	$^{32}pCUSU$	$^{32}pCSUU$	$^{32}pCUUS$
^{32}pCU	$^{32}pCUS$	$^{32}pCSU$	$^{32}pCUU$
^{32}pC	^{32}pCU	^{32}pCS	^{32}pCU
	^{32}pC	^{32}pC	^{32}pC

Tabelle 2: Verzeichnis der Reaktionsprodukte von $^{32}pCUCAG$, $^{32}pCUSUUX$, $^{32}pCSUUUX$ und $^{32}pCUUSUX$, die nach einem kontrollierten Abbau der Fragmente mit Schlangengiftphosphodiesterase resultieren müssen. Von oben nach unten sind Fragmente angegeben, die sich durch den sukzessiven Verlust eines 5'- Mononukleotids am 3'- Ende auszeichnen.

Die Autoradiographien der Reaktionsprodukte ergaben für beide

Oligonukleotide dieselbe 5'- terminale Sequenz ^{32}pCU . Mit Hilfe der M- Werte nach Sanger (vgl. 5.2.15.3) konnte man die Nukleotidfolge von CUSUUX sehr gut bis CUSU ermitteln. Für die Zuordnung der restlichen Bestandteile war die Auflösung nicht hoch genug; das erhaltene Ergebnis zeigte jedoch eindeutig, daß der Sequenzvorschlag (a) richtig war: CUSUUX.

Bei der Spaltung von ΨCUG mit Schlangengiftphosphodiesterase traten Ψ , pU, pC und pG auf. Die Anwesenheit von pG zeigte, daß es sich um das 3'- terminale Ende des zu sequenzierenden Oligonukleotids T_1 16 handelte. Zur Aufklärung der Nukleotidsequenz dieses Partialfragments machte man sich den Whitfeldabbau zunutze (48,49), wonach unter geeigneten Bedingungen das endständige Nukleosid am 3'- Ende abgespalten wird (Abbildung 16).

Im vorliegenden Falle entstand nach dieser Reaktion und einer anschließenden Behandlung des Reaktionsproduktes mit alkalischer Phosphatase sowie Reinigung des Umsetzungsproduktes auf einer Dünnschichtplatte in Laufmittel B ein Trinukleosiddiphosphat. Die Nukleotidfolge konnte durch eine Spaltung mit Ribonuklease T_2 und anschließender Dünnschichtchromatographie in den Laufmitteln A und C eindeutig aufgeklärt werden. Die Identifizierung von Ψ p, Cp und U im erwarteten molaren Verhältnis ließ nur die Sequenz ΨCU zu, womit dieses Teilfragment mit ΨCUG als bewiesen gelten konnte.

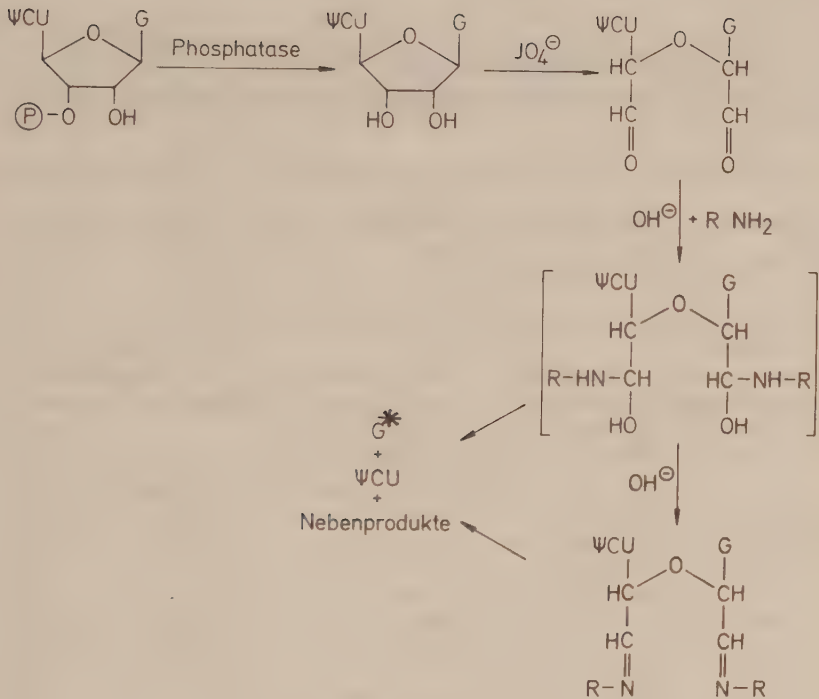


Abb. 16: Reaktionsschema zum Whitfeldabbau (48,49) des Tetranukleotids ΨCUG zum Trinukleotid ΨCU .

Die Zusammenfassung aller Ergebnisse aus 3.4.2.16 läßt die Aufstellung der Sequenz des Oligonukleotids T_1 16 zu. Demnach muß das pankreatische Fragment AC durch die Nukleotidfolge CUSUUX fortgeführt werden (ACUSUUX). Die zweite Überlappungsstelle lieferte das Ribonuklease A - Fragment $\text{X}\Psi$ mit der Verknüpfung von ACUSUUX und ΨCUG zur Gesamtsequenz von ACUSUUX ΨCUG . Die Berücksichtigung der molaren Verhält-

nisse der einzelnen Komponenten bestätigte dieses Ergebnis.

3.4.2.17. Zusammenstellung der Sequenzierungsmethoden der Ribonuklease T₁- Fragmente von T₁ 1 bis T₁ 16

In der Tabelle 3 sind die Methoden aufgeführt, die eindeutige Aussagen über die Nukleotidsequenz des jeweils untersuchten Oligonukleotids machten:

Oligo-nukleotid	Methoden	Spaltprodukte	Sequenz
T ₁ 1	T ₂ , DC: D/E T ₂	Cp, A 2 Cp, 1 A	CCA
T ₁ 2	T ₂ , DC: D/E DC: A, B, C	Gp Gp	Gp
T ₁ 3	T ₂ , DC: D/E T ₂	Cp, Gp Cp, Gp	CG
T ₁ 4	T ₂ , DC: D/E P S	Ap, Gp A, pG	2 AG
T ₁ 5	T ₂ , DC: D/E P S Alkaliprobe	Cp, Gp pC, pG D	DCG

Fortsetzung von Tabelle 3

Oligo- nukleotid	Methoden	Spaltprodukte	Sequenz
T_1 6	T_2 , DC: D/E P p-P T_2 Alkaliprobe	Ap, Gp ApG Ap, G D	DAG
T_1 7	DC: C P, DC: A, B, C	pGp G	pGp
T_1 8	T_2 , DC: D/E P S CMCT p-P (a) $N(C_2H_5)_3$ S	Up, Cp, Gp U, pU, pC, pG U^*U^*CG $U^*U^*C^{(a)}$, G UUC U, pU, pC	UUCG
T_1 9	T_2 , DC: D/E P S T_2	Cp, Gp C, 2 pC, pG 3 Cp, G	CCCG

Fortsetzung von Tabelle 3:

Oligo-nukleotid	Methoden	Spaltprodukte	Sequenz
T_1 10	T_2 , DC: D/E p-P (a) S (b) S (c) T_2 (d) Massen-spektrum	Ap, Gp, m^1Ap , $Tm\psi$ /p, Cp $Am^1AG^{(a)}$, $Tm\psi^{(b)}$, C pG, (Am^1A + Am^6A) $^{(c)}$ $Tm^{(d)}$, $p\psi$ Ap, m^6A , m^1A 2'O- Methylri- bothymidin	$Tm\psi CAM^1AG$
T_1 11	T_2 , DC: D/E p-P (a) S (b) S	Ap, Up, m^2Gp $ApU^{(a)}$, $Ap m^2G^{(b)}$ A, pU A, pm^2G	$AUAm^2G$
T_1 12	T_2 , DC: D/E P S p-P (a) T_2	Cp, Ap, Up, Gp C, pU, pC, pA, pG $ApG^{(a)}$, C, U Ap, G	

Fortsetzung von Tabelle 3:

Oligo- nukleotid	Methoden	Spaltprodukte	Sequenz
T ₁ 12 Fortsetzung	CMCT p-P (b) N(C ₂ H ₅) ₃ (c) T ₂ (d) T ₂	CU* [*] CAG C, UpC ^(b) *, ApG ^(c) UpC ^(d) Ap, G Up, C	CUCAG
T ₁ 13	T ₂ , DC: D/E P S p-P (a) T ₂ (b) T ₂ (c) Alkali probe	m ⁵ Cp, Cp, Gp, Ap, m ⁷ Gp m ⁷ G, pm ⁵ C, pC pA, pG m ⁷ GpD ^(a) , m ⁵ C C, ApG ^(b) m ⁷ Gp, D ^(c) Ap, G D	m ⁷ GDm ⁵ Cm ⁵ CAG
T ₁ 14	T ₂ , DC:D/E P S	Up, Cp, Gp U + 5'- Mono- nukleotide	

Fortsetzung von Tabelle 3:

Oligo- nukleotid	Methoden	Spaltprodukte	Sequenz
T ₁ 14 Fortsetzung	T ₂ CMCT p-P (1,2) _{N(C₂H₅)₃ (c)_{T₂} (d)_{T₂}}	2 Up, 3 Cp, Gp U*CCCU*G* U*pC ^(a) , C U*pG ^(b) , U*pG* ^(b) UpC ^(c) , UpG ^(d) Up, C Up, G	UCCCUG
T ₁ 15	T ₂ , DC: D/E P p-P (a) _{T₂} (b) _{T₂} S (c) _S	Cp, Ap, Ψp, Gp C, ApΨ ^(a) , ApG ^(b) Ap, Ψ Ap, G CAΨ ^(c) , pA, pG wenig C und pΨ C, pA, pΨ	CAΨCAG
T ₁ 16	T ₂ , DC: D/E P DE23	Ap,Cp,Up, Ψp, Gp, Xp	

Fortsetzung von Tabelle 3:

Oligo- nukleotid	Methoden	Spaltprodukte	Sequenz
T ₁ 16 Fortsetzung	p-P	ApC ^(a) , U, G, SpU ^(b) , C, XAψ ^(c)	
	(a) T ₂	Ap, C	
	(b) S	S, pU	
	(c) S	X, pA, pψ	
	U ₂	Ap! ^(d) , ψpCpUpG ^(e) , CUSUUX ^(f)	
	(d) T ₂	Ap	
	(e) S	ψ, pC, pU, pG	
	(e) Whitfield	ψpCpUp ^(g)	
	(g) P	ψpCpU ^(h)	
	(h) T ₂	ψp, Cp, U	
	(f) γ-[³² H] -		
	ATP	³² pCUSUUX ⁽ⁱ⁾	
	(i) S	³² pC, ³² pCU, ³² pCUS, ³² pCUSU	

Tabelle 4: Verzeichnis der Methoden, die zur Aufklärung der Sequenzen der einzelnen Fragmente führten. Sämtliche Spaltprodukte wurden dünn-schichtchromatographisch in einem geeigneten Laufmittel getrennt.

Von allen Nukleosiden und Nukleotiden wurden bei pH 1, pH 7 und pH 13 UV- Spektren aufgenommen.

Die Abkürzungen in der Spalte "Methoden" bedeuten jeweils: DC = Dünnschichtchromatographien in den entsprechenden Laufmitteln; P = Behandlung mit alkalischer Phosphatase; T_2 = Spaltung mit Ribonuklease T_2 ; S = Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase; p-P = kombinierte Spaltung mit Ribonuklease A und alkalischer Phosphatase; U_2 = Spaltung mit Ribonuklease U_2 ; CMCT = Modifizierung von Uridinen in Oligonukleotiden nach Gilham (35,36); $N(C_2H_5)_3$ = Behandlung eines chemisch modifizierten Oligonukleotids mit Triäthylamin zur Entfernung von CMCT; Whitfeld = Whitfeldabbau von Oligonukleotiden (48,49); γ - $[^{32}P]$ -ATP = $[^{32}P]$ - Phosphorylierung von Oligonukleotiden am 5'- Ende mit γ - $[^{32}P]$ -ATP und T_4 - Kinase (43-47); Alkaliprobe = Nachweisreaktion zur Identifizierung von Dihydrouridinen (33,34).

3.4.2.18. Unmittelbare Überlappingsstellen zwischen Ribonuklease T_1 - und Ribonuklease A - Fragmenten (28)

Die Sequenzanalyse der pankreatischen und T_1 - Oligonukleotide ergab für mehrere Fragmente direkte Überlappingsstellen. Die Anwesenheit von $AUAm^2G$ (T_1 - Oligonukleotid) und Am^2GC (pankreatisches Oligonukleotid) ergab eine eindeutige Verknüpfung zwischen diesen beiden Oligonukleotiden zu $AUAm^2GC$. Da nur ein pankreatisches Fragment mit dem 3'- terminalen Ende AU vorlag, nämlich GGAU, konnte die Sequenz $AUAm^2GC$ um

dieses Tetranukleotid verlängert, als GGAUAm²GC angegeben werden.

Das pankreatische Tetranukleotid AGAC war das einzige, dessen 3'- Ende von AC gebildet wurde; dazu korrespondierte das Oligonukleotid T₁ 16, das am 5'- Ende AC trug. Somit mußten die beiden Sequenzen in tRNA₃^{Lys} miteinander verbunden als AGACUSUUXAψCUG vorliegen.

Eine weitere Verknüpfung lieferte die Identifizierung des seltenen Nukleosids N⁷- Methylguanosin (m⁷G) im pankreatischen Fragment AGGm⁷GD sowie im T₁- Oligonukleotid m⁷Gm⁵C-m⁵CAG; daraus resultierte die überlappende Sequenz von AGGm⁷Gm⁵Cm⁵CAG.

Wegen des 2'O- Methylribothymidins ergab sich die Verbindung des pankreatischen Oligonukleotids AGGGTmψ und des T₁- Bruchstückes TmψCm¹AG zu AGGGTmψCm¹AG. Eine Verlängerung dazu erbrachte das pankreatische Fragment Am¹AGU, woraus die Nukleotidfolge AGGGTmψCm¹AGU resultierte.

Diese überlappenden Sequenzen, die sich direkt aus der Analyse der Ribonuklease T₁ - bzw. Ribonuklease A - Oligonukleotide ergaben, sind in Tabelle 8, Punkt A unter dem Abschnitt 3.6.6 zusammengefaßt.

3.5. Sequenzierung von Kaninchenleber - tRNA₃^{Lys}-Ribonuklease T₁- Fragmenten mittels radioaktiver Techniken

Neben der Anwendung "klassischer" Methoden gewinnen die radioaktiven Arbeitstechniken immer mehr an Bedeutung. Von unübersehbarem Vorteil ist dabei der wesentlich geringere Materialverbrauch.

Kaninchenleber - tRNA₃^{Lys} wurde mit Ribonuklease T₁ gespalten und anschließend mit alkalischer Phosphatase behandelt. Nach Inaktivierung der Phosphatase mit Nitrilotriessigsäure wurde das resultierende Oligonukleotidhydrolysat am 5'-Ende mit γ -[³²P]-ATP und Polynukleotidkinase phosphoryliert (43-47). Zur Trennung der Fragmente diente eine zweidimensionale Hochspannungselektrophorese (1. Dimension auf Zelluloseacetatstreifen in Pyridin/Acetat pH 4,9; 2. Dimension auf Whatman DE81- Papier in 7%iger HCOOH). Die Autoradiographie dieser Auftrennung bestätigte die außerordentliche Reinheit der zu sequenzierenden Lysin - tRNA (Abbildung 17).

Die den Schwärzungen der Autoradiographie entsprechenden Bereiche wurden ausgeschnitten, die Radioaktivität mittels Čerenkov - Zählung ermittelt und anschließend mit 2 M TEAB pH 8,5 eluiert.

Die aus der zweidimensionalen Hochspannungselektrophorese isolierten Oligonukleotide wurden einem kontrollierten, d.h.

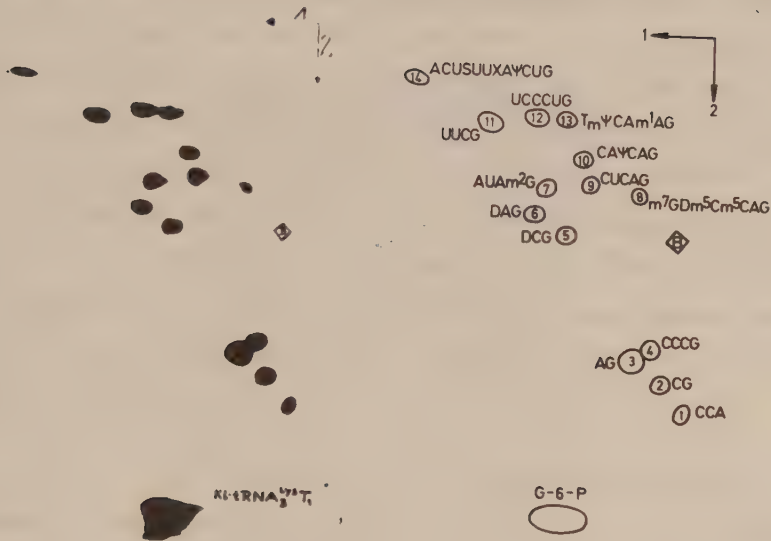


Abb. 17: Autoradiographie eines "fingerprints", erhalten durch zweidimensionale Hochspannungselektrophorese eines in vitro [³²P]-markierten Ribonuklease T₁ - Hydrolysats von Kaninchenleber - tRNA₃^{Lys}.

limitierenden Abbau mit Schlangengiftphosphodiesterase zugeführt. Wie unter 5.2.15.3 beschrieben, wurden die verschiedenen Oligonukleotide auf Whatman DE81 - Papier aufgetragen. Zusätzlich trug man authentisches pA, pC, pU und pG auf, um die 5'- terminalen Endgruppen eindeutig festlegen zu können. Die entsprechende eindimensionale Hochspannungselektrophorese wurde in Pyridin/Acetat pH 3,5 ausgeführt. Zur Auswertung der Ergebnisse wurden die M- Werte

nach F. Sanger (50) herangezogen (Abbildung 18).

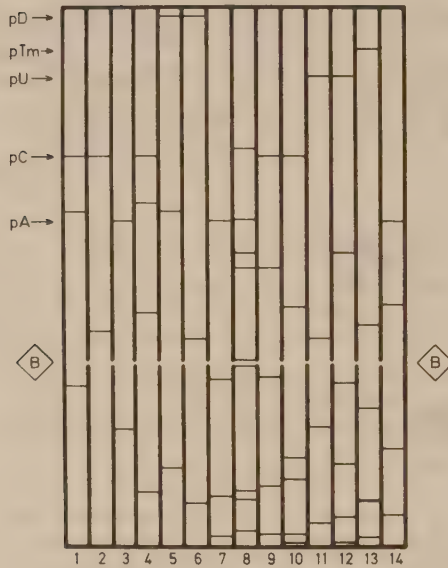


Abb. 18: Ergebnisse aus dem schrittweisen Abbau mit Schlangengiftphosphodiesterase der 5'-[³²P]-markierten Ribonuklease T₁ - Fragmente von tRNA^{Lys}₃. Die Nummerierung der Oligonukleotide stimmt mit der in Abbildung 17 überein. Die Darstellung der partiellen Spaltprodukte ist auf Grund einer entsprechenden Autoradiographie (vgl. Abb. 21) schematisiert dargestellt.

Die beim Oligonukleotid m⁷Gm⁵Cm⁵CAG (Nr. 8 in Abb. 17) doppelt auftretenden Banden waren durch die Instabilität von m⁷G erklärbar.

Das Spaltmuster für die Sequenz ACUSUUXA~~W~~CUG (Nr. 14 in Abb. 17) war natürlich nicht zufriedenstellend. Die geringe Auflösung war darauf zurückzuführen, daß Oligonukleotide größerer Kettenlängen keine oder nur sehr geringe elektrophoretische Mobilität besitzen. In der ersten Phase des schrittweisen Abbaues mit Schlangengiftphosphodiesterase traten lange Fragmente auf, denen wegen zu geringer Mobilitätsdifferenzen keine M- Werte mehr zugeordnet werden konnten, die Rückschlüsse auf die Nukleotidzusammensetzung am 3'- Ende erlaubt hätten.

Dieses Problem konnte durch den Einsatz der Homochromatographie gelöst werden (51,52). Ein durch kontrollierte Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase erhaltenes Hydrolysat von ³²PACUSUUXA~~W~~CUG wurde in der ersten Dimension durch Hochspannungselektrophorese an Zelluloseacetat (Puffer: Pyridin/Acetat pH 3,5) aufgetrennt. Nach Übertragung auf eine DEAE- Zelluloseplatte wurden die Spaltprodukte durch ein geeignetes RNA- Hydrolysat als Laufmittel in der zweiten Dimension aufgelöst. Wie die Abbildung 19 zeigt, konnte durch die entsprechende Hochspannungselektrophorese/Homochromatographie die Sequenz ACUSUUXA~~W~~CUG bestätigt werden.

Die Ergebnisse der Sequenzanalysen der restlichen [³²P]- markierten Oligonukleotide brachte in keinem Punkt eine Diskrepanz zu den Resultaten der "klassischen" Sequenzierung. Damit war die Tauglichkeit der in vitro Phosphorylierung für

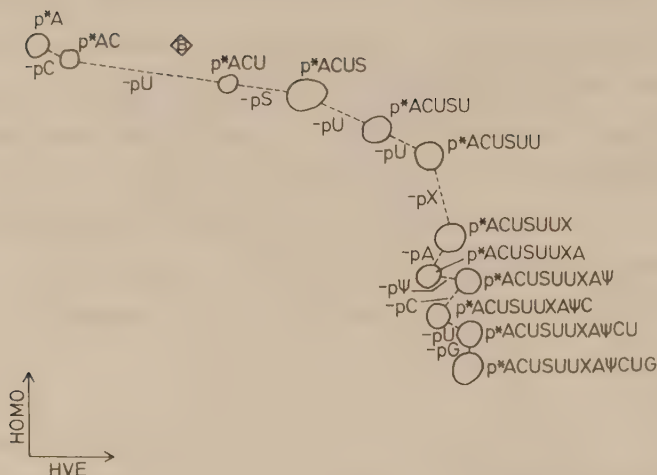


Abb. 19: Schematische Wiedergabe einer Autoradiographie, erhalten durch kontrollierte Spaltung von 32 pACUSUUXAΨCUG mit Schlangengiftphosphodiesterase, gefolgt von zweidimensionaler Hochspannungselektrophorese/Homochromatographie. Der sukzessive Verlust eines 5'- Mononukleotids vom 3'- Ende her macht sich durch eine charakteristische Mobilitätsdifferenz bemerkbar, die das abgespaltene Nukleotid eindeutig festlegt.

die Sequenzanalyse von tRNAs bewiesen .

Eine interessante Entdeckung, nämlich die Verwendung von Pyridin/Acetat pH 4,9 für die erste Dimension der Hochspannungselektrophorese anstelle von Pyridin/Acetat pH 3,5

ergab eine verbesserte Auftrennung für die beiden Oligonukleotide UCCCUG und $Tm\psi Cam^1AG$. Die Abbildung 20 zeigt einen Vergleich zwischen zwei zweidimensionalen Hochspannungselektrophoresen, wobei die beiden verschiedenen Puffersysteme für die erste Dimension verwendet wurden.



Abb. 20: Zweidimensionale Hochspannungselektrophorese von Kaninchenleber - $tRNA_3^{Lys}$ - Ribonuklease T_1 - Oligonukleotiden in Pyridin/Acetat pH 3,5 und Pyridin/Acetat pH 4,9. In der linken Abbildung trennten sich die beiden Oligonukleotide UCCCUG und $Tm\psi Cam^1AG$ (vgl. Abb. 17: T_1 12 und T_1 13) deutlich voneinander, während das rechte Bild in diesem Bereich nur einen Fleck zeigt, der UCCCUG und $Tm\psi Cam^1AG$ als Gemisch enthielt.

Linkes Bild: 1. Dimension : Pyridin/Acetat pH 4,9.

Rechtes Bild : 1. Dimension: Pyridin/Acetat pH 3,5.

Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, daß bei bestimmten Trennproblemen statt des normalen Puffersystems bei pH 3,5 für die erste Dimension die Verwendung von Pyridin/Acetat pH 4,9 die bessere Auflösung erzielt.

3.6. Partialsplattungen und Ableitung der Nukleotidsequenz von Kaninchenleber - tRNA₃^{Lys}

Die Sequenzierung von Fragmenten, die nach der Behandlung von tRNA₃^{Lys} mit Ribonuklease T₁ und Ribonuklease A entstanden waren, lieferte nicht genügend Informationen um eindeutige Aussagen über die Primärstruktur der gesamten tRNA zuzulassen. Demnach war es unumgänglich, größere tRNA - Fragmente nach geeigneten Methoden zu isolieren und auf ihre Nukleotidsequenzen hin zu überprüfen.

Durch eine Mg²⁺ katalysierte, alkalische Hydrolyse nach Wintermeyer und Zachau (53) gelang es K. Limburg (28) längere Fragmente zu isolieren, die für weitere Experimente geeignet waren. Ein Aufbrechen von tRNAs unter Mg²⁺ Einfluß im Alkalischen ist bevorzugt in pyrimidinreichen einsträngigen Bereichen.

Die erhaltenen Bruchstücke wurden nach Kettenlänge über eine DEAE- Zellulose DE23- Säule in 7 M Harnstoff getrennt. Dabei wurden fünf Gruppen von Oligonukleotiden erhalten (I - V), die durch Rechromatographie weiter aufgetrennt wurden. Die

Nomenklatur der einzelnen Fraktionsbereiche nach Rechromatographie richtete sich nach der Herkunft. An die entsprechenden römischen Ziffern I bis V wurden große Buchstaben (A, B, C...) angefügt, die dadurch die einzelnen Bereiche optischer Dichte eindeutig klassifizierten.

3.6.1. Nukleotidzusammensetzung der Fragmente IC und IE

Die Fraktion I mußte nach den Trennungskriterien von DEAE-Zellulose die kürzesten Fragmente enthalten.

Aliquote von IA bis IE wurden mit Ribonuklease T_1 gespalten und anschließend mit alkalischer Phosphatase behandelt. Die 5'-Markierung der Oligonukleotide mit γ -[^{32}P]-ATP erfolgte wie unter 5.2.13 beschrieben. Die Auflösung der Ribonuklease T_1 - Fragmente wurde mittels zweidimensionaler Hochspannungselektrophorese (50) erreicht.

Die Autoradiographien lieferten jeweils mehrere Oligonukleotide, wobei sich zeigte, daß die Ergebnisse aus IA und IB keine verwertbaren Aussagen ergaben. Die Oligonukleotide aus IC, ID und IE wurden einem kontrollierten Abbau mit Schlangengiftphosphodiesterase unterworfen. Die entsprechenden Nukleotidsequenzen wurden mittels der M- Werte nach Sanger (50) ermittelt.

Von IC konnte gezeigt werden, daß es neben dem Tetranukleo-

tid ^{32}pAU enthielt. Die Fragmente aus ID und IE (Abbildung 21) konnten mit $^{32}\text{pCCCG}$, $^{32}\text{pAUAm}^2\text{G}$ bzw. $^{32}\text{pCCCG}$, $^{32}\text{pAUAm}^2\text{G}$ und $^{32}\text{pCUCAG}$ angegeben werden.

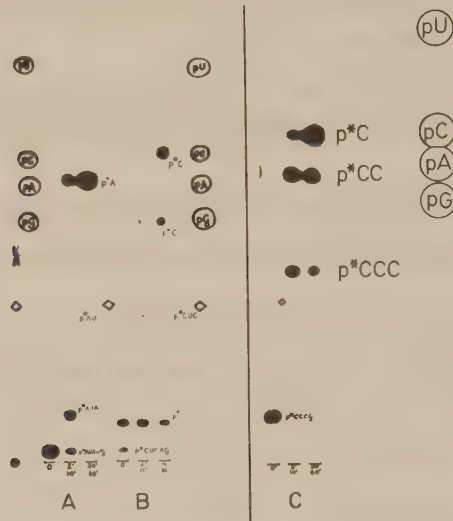


Abb. 21: Spaltung der [^{32}P] - markierten Ribonuklease T_1 - Spaltprodukte aus dem Fragment IE mit Schlangengiftphosphodiesterase und anschließender eindimensionaler Hochspannungselektrophorese in Pyridin/Acetat pH 3,5 (Autoradiographie).

Die Ergebnisse der Oligonukleotidanalyse von IC bis IE nach Behandlung mit Ribonuklease T₁ und Ribonuklease A (28) sind in Tabelle 5 wiedergegeben. Aus diesen Informationen konnten die entsprechenden Sequenzen abgeleitet werden.

Die Nukleotidfolge von IC ließ sich einfach ermitteln. Da

IC: Ribonuklease T ₁	IC: Ribonuklease A
³² pCCCG	³² pGC
³² pAU	³² pGGAU

ID: Ribonuklease T ₁	ID: Ribonuklease A
³² pCCCG	³² pGC
³² pAUAm ² G	³² pGGAU
	³² pAm ² GC

IE: Ribonuklease T ₁	IE: Ribonuklease A
³² pCCCG	³² pGC
³² pAUAm ² G	³² pGGAU
³² pCUCAG	³² pAm ² GC
	³² pAG

Tabelle 5: Ergebnisse der Behandlung von IC bis IE mit Ribonuklease T₁ und Ribonuklease A, sowie der anschließenden Sequenzanalyse der entstandenen Oligonukleotide durch kontrollierten Abbau mit Schlangengiftphosphodiesterase.

³²pAU kein T₁- Fragment sein kann - es fehlt ein 3'- terminales Guanosin oder Guanosinderivat - muß dieses Dinukleotid

das 3'- Ende des Partialfragments IC bilden. Das pankreatische Fragment $^{32}\text{pGGAU}$ erklärt das Auftreten dieses T_1 - Fragments ^{32}pAU . Am 5'- Ende von $^{32}\text{pGGAU}$ fordert die Selektivität von Ribonuklease A ein Pyrimidin; dazu kann hier nur das T_1 - Oligonukleotid $^{32}\text{pCCCG}$ passen: CCCGGAU. Somit ist nur noch das pankreatische Dinukleotid ^{32}pGC unterzubringen, das nur am 5'- Ende von IC lokalisiert sein kann, da der 3'- Terminus nach den obigen Überlegungen festliegt: GCCCGGAU (vgl. Tabelle 8 unter 3.6.6).

Wie aus Tabelle 5 ersichtlich wird, zeichnet sich das Partialfragment ID dadurch aus, daß im Ribonuklease T_1 - Muster kein ^{32}pAU mehr gefunden werden konnte; dagegen wurde ein neues Oligonukleotid identifiziert, dessen Sequenzanalyse die Zusammensetzung $^{32}\text{pAUAm}^2\text{G}$ ergab. Entsprechend zeigte das pankreatische Spaltmuster neben den Oligonukleotiden aus IC ein Trinukleotid $^{32}\text{pAm}^2\text{GC}$. Die Anwesenheit von N^2 - Monomethylguanosin (m^2G) im T_1 - sowie im pankreatischen Oligonukleotid ergibt direkt die Verknüpfung dieser beiden Fragmente zu AUAm^2GC . Unter Berücksichtigung der Nukleotidfolge von IC läßt sich die Position von AUAm^2GC eindeutig festlegen; es kommt nur ein Anschluß an das 3'- Ende von IC in Frage, dessen 3'- terminale Sequenz AU dies zwingend vorschreibt: GCCCGGAUAm}^2\text{GC} (vgl. Tabelle 8 unter 3.6.6).

Neben den schon bekannten, in ID erhaltenen Oligonukleotiden, traten in IE zusätzlich $^{32}\text{pCUCAG}$ (T_1 - Muster) und ^{32}pAG

(pankreatisches Muster) auf. Auffallend war dabei das Auftreten von ^{32}pAG nach Behandlung mit Ribonuklease A. Da dieses Oligonukleotid normalerweise kein Produkt nach Spaltung mit Ribonuklease A ist, muß es das 3'-Ende von IE bilden. Bei der Mg^{2+} -katalysierten alkalischen Hydrolyse war folglich nach diesem ^{32}pAG die Spaltung eingetreten. Da die Nukleotidsequenz von ID am 3'-Ende auf ...m²GC endigt, ist mit dem T₁-Fragment $^{32}\text{pCUCAG}$ der direkte Anschluß gefunden; gleichzeitig damit wird das pankreatische Dinukleotid ^{32}pAG verbraucht. Somit war die Sequenz von IE mit GCCCGGAUAm²G-CUCAG anzugeben (vgl. Tabelle 8 unter 3.6.6).

3.6.2. Sequenzierung des Partialfragments IIIB

Nach Rechromatographie des Fragments III wurden zwei Fraktionen isoliert (IIIA und IIIB), von denen jedoch nur IIIB verwertbare Ergebnisse lieferte. IIIA lag als Gemisch vor, das sich aus mehreren Oligonukleotiden unterschiedlicher Bereiche von $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ zusammensetzte und deshalb für diese Experimente ungeeignet war.

Die Technik zur Gewinnung der am 5'-Ende mit $\gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ phosphorylierten Oligonukleotide, die aus einer Behandlung von IIIB mit Ribonuklease T₁ resultierten, war identisch mit der unter 3.6.1 beschriebenen.

Wie die Abbildung 22 deutlich macht, setzt sich IIIB aus fünf Oligonukleotiden zusammen.



Abb. 22: Autoradiographie einer zweidimensionalen Hochspannungselektrophorese von IIIB (1. Dimension: Pyridin/Acetat pH 4,9; 2. Dimension: 7%ige HCOOH) nach der Behandlung dieser Fraktion mit Ribonuklease T_1 und 5'-Phosphorylierung der entstandenen Fragmente mit γ -[^{32}P]-ATP.

Die Tabelle 6 umfaßt fünf Oligonukleotide nach Spaltung mit Ribonuklease T_1 und vier Fragmente, die nach Behandlung mit Ribonuklease A (28) entstanden waren und deren Sequenzen durch Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase bestimmt wurden.

Bei der Identifizierung der einzelnen Ribonuklease T_1 - Frag-

IIIB: Ribonuklease T ₁	IIIB: Ribonuklease A
³² pAG	³² pAΨ
³² pDCG	³² pGGD
³² pDAG	³² pAGAC
³² pCAΨCAG	³² pAGAGC
³² pACUSUU	

Tabelle 6: Ergebnisse aus der Behandlung von IIIB mit Ribonuklease A und Ribonuklease T₁ sowie der Sequenzierung der resultierenden Oligonukleotide durch kontrollierten Abbau mit Schlangengiftphosphodiesterase.

mente wurde eines gefunden, dessen 3'- terminales Nukleosid nicht Guanosin war (³²pACUSUU). Aus der "klassischen" Sequenzierung war bekannt, daß die Fortsetzung dieser Sequenz mit ...XAΨCUG anzugeben ist. Hier hatte folglich die Spaltung bei der Mg²⁺- katalysierten alkalischen Hydrolyse stattgefunden; ³²pACUSUU mußte demnach das 3'- Ende von IIIB sein.

Nur ³²pCAΨCAG trägt am 5'- Ende ein Cytidin; passend dazu existiert ebenfalls nur ein pankreatisches Fragment, das auf ...GC endigt (³²pAGAGC) und somit die Bedingungen einer Verbindung der beiden Komponenten erfüllt: AGAGCAΨCAG.

Zur Verlängerung des Oligonukleotids AGAGCAΨCAG standen noch

zur Verfügung: die T_1 - Fragmente $^{32}pDCG$ und $^{32}pDAG$ sowie das pankreatische Oligonukleotid $^{32}pGGD$. Für $^{32}pGGD$ besteht die Möglichkeit mit $^{32}pDAG$ oder $^{32}pDCG$ zu GGDCG oder GGDAG zusammenzutreten. Am 5'- Ende von $^{32}pAGAC$ waren nach den Gesetzen der Spezifität von Ribonuklease A nur Pyrimidine (U, C, D) möglich. Im vorliegenden Fall kam nur $^{32}pDAG$ in Frage, da kein verwendbares T_1 - Fragment vorlag, das am 3'- Ende mit ...UAG oder ...CAG abschloß. Mit dem dadurch zwingenden Anschluß von D an das 5'- Ende von AGAGCA/CAG war auch die Position von $^{32}pGGD$ eindeutig festgelegt: GGDAGAGCA/CAG. Diese Sequenz konnte nun durch das pankreatische Fragment $^{32}pAGAC$ mit dem 3'- Ende von IIIB verknüpft werden: GGDAGAGCA/CAGACUSUU. Das T_1 - Oligonukleotid $^{32}pDCG$ mußte somit das 5'- Ende von IIIB bilden: DCGGDAGAGCA/CAGACUSUU (vgl. Tabelle 8 unter 3.6.6).

3.6.3. Verknüpfung der Partialfragmente IE und IIIB

Im zweidimensionalen pankreatischen "fingerprint" von Kaninchenleber $tRNA_3^{Lys}$ existiert ein Oligonukleotid $^{32}pAGD$, das weder in IE, IIIB, noch im später zu besprechenden IVD vorkommt. Aus der "klassischen" Sequenzierung sind nur zwei Oligonukleotide bekannt, die mit AGD verknüpft werden können: DCG und DAG. Beide wurden als Bestandteil von IIIB identifiziert. Nach den Ergebnissen aus 3.6.2 ist $^{32}pDCG$ am 5'- Ende von IIIB lokalisiert. Wegen der Selektivität von Ribonuklease T_1 muß das 5'- Ende von $^{32}pDCG$ in der Gesamtsequenz

mit einem Guanosin verknüpft sein; diese Bedingung fordert ein pankreatisches Oligonukleotid, das auf ...GD endet. Dieser Eigenschaft genügen nur zwei pankreatische Fragmente: $^{32}\text{pGGD}$ und AGD. Die Position von $^{32}\text{pGGD}$ ist in IIIB schon eindeutig fixiert, so daß nur noch AGD mit dem 5'- Ende von IIIB verknüpft sein kann.

Das Partialfragment IE trägt am 3'- Terminus ...CAG - ^{32}pAG wurde im pankreatischen "fingerprint" von IE gefunden - , das in 3'- Richtung von einem Pyrimidin gefolgt sein muß (vgl. 3.6.1). Diese Bedingung erfüllt nur das Trinukleotid AGD; somit ist die Verknüpfung von IE und IIIB zweifelsfrei hergestellt.

3.6.4. Charakterisierung des Fragments IVD

Die Behandlung dieses Fragments mit Ribonuklease T_1 und alkalischer Phosphatase sowie 5'-[^{32}P] - Markierung der resultierenden Oligonukleotide und anschließende zweidimensionale Hochspannungselektrophorese in Pyridin/Acetat pH 4,9 (1. Dimension) und 7% HCOOH (2. Dimension) zeigte, daß es sich um ein relativ langes Oligonukleotid handeln mußte.

Wie die Abbildung 23 zeigt, konnten acht verschiedene Oligonukleotide getrennt werden. Der schrittweise Abbau mit Schlangengiftphosphodiesterase der einzelnen Oligonukleotide erbrachte eindeutig deren Nukleotidzusammensetzung. Die Über-

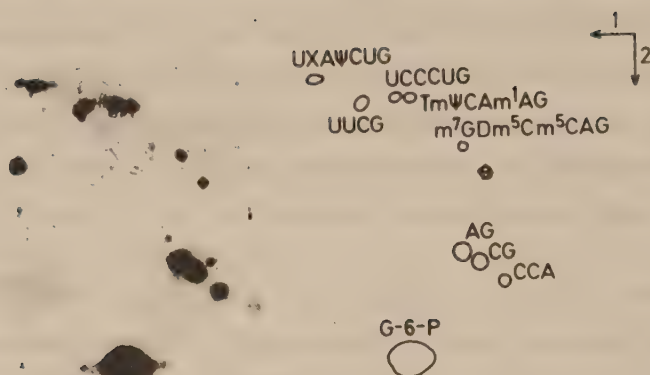


Abb. 23: Zweidimensionale Hochspannungselektrophorese von IVD nach einer Spaltung mit Ribonuklease T_1 , Behandlung mit alkalischer Phosphatase und 5'-[^{32}P]-Markierung der resultierenden Oligonukleotide.

lappungsstellen ergaben sich zweifelsfrei aus den Ribonuklease T_1 - und den pankreatischen Fragmenten sowie früheren Ergebnissen, die sich mit der Nukleotidsequenz eines 30 Nukleotide langen Stückes des 3'- Endes von Kaninchenleber-tRNA₃^{Lys} beschäftigten (54).

Die erhaltenen Oligonukleotide wurden isoliert und zur Aufklärung ihrer Nukleotidzusammensetzung einem kontrollierten Abbau mit Schlangengiftphosphodiesterase unterworfen.

Die Tabelle 7 enthält acht Fragmente aus IVD, die nach Behandlung mit Ribonuklease T_1 entstanden waren und sieben Oligo-

nukleotide, die aus einer Spaltung mit Ribonuklease A resultierten (28):

IVD: Ribonuklease T ₁	IVD: Ribonuklease A
³² pCG	³² pGU
³² pAG	³² pGC
³² pCCA	³² pXAV
³² pUUCG	³² pGGGC
³² pUCCCUG	³² pAm ¹ AGU
³² pTm ^ψ /CAm ¹ AG	³² pGAGGm ⁷ GD
³² pm ⁷ GDm ⁵ Cm ⁵ CAG	³² pAGGGTm ^ψ
³² pUXAVCUG	

Tabelle 7: Aus der Behandlung von IVD mit Ribonuklease T₁ und Ribonuklease A resultierende Oligonukleotide.

Das Vorliegen von Tm im pankreatischen Oligonukleotid ³²pAGGGTm^ψ und im T₁- Bruchstück ³²pTm^ψ/CAm¹AG ermöglichte die erste Verknüpfung zu AGGGTm^ψ/CAm¹AG (vgl. 3.4.2.18). Das 3'-Ende dieses Fragments konnte man sofort mit dem pankreatischen Bruchstück ³²pAm¹AGU verbinden: AGGGTm^ψ/CAm¹AGU.

Am 5'- Ende des pankreatischen Fragments ³²pAGGGTm^ψ muß ein Pyrimidin lokalisiert sein; deshalb ist nach einem T₁-

Oligonukleotid zu suchen, welches am 3'- Ende die Sequenz PyrAG hat und damit eine Überlappung aufweist, die eine Verlängerung von $^{32}\text{pAGGGTm}\Psi$ in 5'- Richtung gestattet. Diese Bedingung erfüllt nur das Oligonukleotid $^{32}\text{pm}^7\text{GDm}^5\text{Cm}^5\text{CAG}$; daher ergibt sich eindeutig: $\text{m}^7\text{GDm}^5\text{Cm}^5\text{CAGGGTm}\Psi\text{Cam}^1\text{AGU}$.

Das Vorliegen von m^7GD am 5'- Ende von $^{32}\text{pm}^7\text{GDm}^5\text{Cm}^5\text{CAG}$ erlaubt die nächste Verknüpfung und zwar mit dem pankreatischen Oligonukleotid $^{32}\text{pGAGGm}^7\text{GD}$ (vgl. 3.4.2.18), wodurch auch das Dinukleotid ^{32}pAG aus Tabelle 7 untergebracht ist: $\text{GAGGm}^7\text{GDm}^5\text{Cm}^5\text{CAGGGTm}\Psi\text{Cam}^1\text{AGU}$.

Ein 30 Nukleotide langes Fragment von $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$, welches das 3'- Ende dieser tRNA enthielt und durch Anilinspaltung am m^7G erzeugt worden war (54), enthielt nach den Ergebnissen von H.J. Gross (54,56,57) alle in IVD ebenfalls identifizierten Fragmente mit Ausnahme der Ribonuklease T_1 - Oligonukleotide ^{32}pAG und $^{32}\text{pUXA}\Psi\text{CUG}$. Nachdem ^{32}pAG schon eingeordnet werden konnte, ließen diese Informationen für $^{32}\text{pUXA}\Psi\text{CUG}$ nur eine einzige Position zu, am 5'- Ende des bisherigen Nukleotidstranges: $\text{UXA}\Psi\text{CUGAGGm}^7\text{GDm}^5\text{Cm}^5\text{CAGGGTm}\Psi\text{Cam}^1\text{AGU}$.

Jetzt waren noch drei pankreatische und vier T_1 - Oligonukleotide in der Sequenz unterzubringen (^{32}pGC , $^{32}\text{pGGGC}$, ^{32}pGU , ^{32}pCG , $^{32}\text{pCCA}$, $^{32}\text{pUUCG}$, $^{32}\text{pUCCCUG}$), die zwischen dem oben abgeleiteten Oligonukleotid und der 3'- terminalen $^{32}\text{pCCA}$

lokalisiert sein mußten.

Die Reihenfolge von ^{32}pGC , ^{32}pCG und $^{32}\text{pGGGC}$ war nur durch weitere Experimente festlegbar (54,56):

Mit Schlangengiftphosphodiesterase wurde das 3'- terminale CCA- Ende von $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ entfernt. Mit tRNA- Nukleotidyltransferase und $\alpha\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-CTP}$ sowie ATP gelang es, das CCA- Ende wieder zu reparieren. Die 5'-3'- Verknüpfung zwischen den beiden Cytidinen und dem in 5'- Richtung benachbarten Guanosin kommt somit jeweils durch ein radioaktives Phosphat zustande. Bei einer Spaltung dieser so markierten $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ mit Ribonuklease T_1 wurde neben dem erwarteten C^{32}CpA noch ein radioaktives Dinukleotid isoliert, welches daher an das 5'- Ende von CCA anschließen mußte: CpG^{32}p . Daraus folgt die Sequenz: CGCCA^{OH} (3'). Zur Fortsetzung der Nukleotidfolge war ein pankreatisches Fragment zu suchen, dessen 3'- Terminus auf ...GC endet. Als einziges solches Bruchstück stand noch $^{32}\text{pGGGC}$ zur Verfügung (^{32}pGC wurde in CGCCA verbraucht): GGGCGCCA .

Aus Tabelle 7 waren noch die beiden T_1 - Oligonukleotide $^{32}\text{pUUCG}$ und $^{32}\text{pUCCCUG}$ sowie das pankreatische Dinukleotid ^{32}pGU unterzubringen, die zwischen $\text{UXA}\Psi\text{CUGAGGm}^7\text{Gdm}^5\text{Cm}^5\text{CAG-}$ $\text{GGTm}\Psi\text{Cam}^1\text{AGU}$ und GGGCGCCA lokalisiert sein mußten.

Es resultierten somit für IVD zwei Sequenzalternativen:

- (A) UXAYCUGAGGm⁷GDm⁵Cm⁵CAGGGTm^ψCam¹AGUCCCUGU^ψCGGGCGCCA
 (B) UXAYCUGAGGm⁷GDm⁵Cm⁵CAGGGTm^ψCam¹AGU^ψCGGUCCCUGGGCGCCA

Durch die Verknüpfung von ³²pUCCCUG und ³²pUUCG ergab sich sowohl in (A) als auch in (B) das pankreatische Dinukleotid ³²pGU aus Tabelle 7. Versuchte man die beiden Sequenzalternativen von IVD in Form des "Kleeblatts" anzuordnen, so gelang das nur für die Alternative (A), wie die Abbildung 24 zeigt:

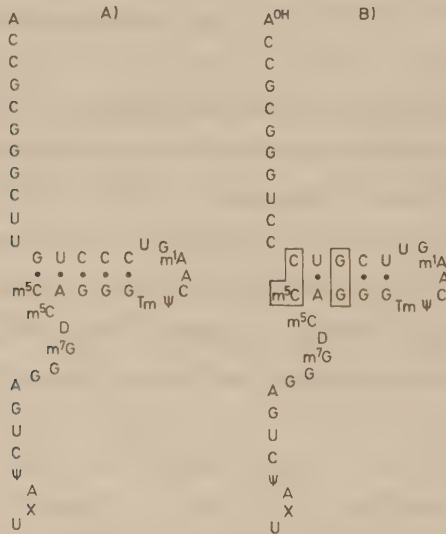


Abb. 24: Anordnung der Sequenzalternativen (A) und (B) als Teil eines tRNA- Kleeblatts.

Bei einer Behandlung mit Schlangengiftphosphodiesterase un-

ter geeigneten Bedingungen sollten die einsträngigen Teilsequenzen am 3'- Ende von (A) bzw. (B) relativ leicht abgebaut werden. K. Limburg (28) gelang es zu zeigen, daß bei einem solchen kontrollierten Abbau von IVD das Oligonukleotid UUCG nicht resistent, das Oligonukleotid UCCCUG jedoch geschützt war, d.h. in einem doppelsträngigen Bereich lokalisiert sein mußte. Damit war die Alternative (A) bewiesen.

3.6.5. Verknüpfung von IIIB und IVD

Bei der Sequenzanalyse von IIIB ergab sich als 3'- Ende die Nukleotidfolge ...ACUSUU, während in IVD dem 5'- Ende das Oligonukleotid UXAVCUG... zugeschrieben werden konnte. In der "klassischen" Sequenzierung war die Nukleotidzusammensetzung von T_1 16 eindeutig mit ACUSUUXAVCUG charakterisiert worden. Diese Information lieferte den Beweis der Verknüpfung des Partialfragments IIIB mit dem Ribonukleotidstrang IVD.

Damit waren alle Oligonukleotide in einer Nukleotidsequenz für die $tRNA_3^{Lys}$ aus Kaninchenleber angeordnet (vgl. Tabelle 8 unter 3.6.6).

3.6.6. Zusammenstellung der Ergebnisse aus der Mg^{2+} - katalysierten alkalischen Hydrolyse und die Nukleotidsequenz von Kaninchenleber $tRNA_3^{Lys}$

Wie aus Tabelle 8 zu entnehmen ist, lautet die Nukleotidse-

quenz von Kaninchenleber tRNA₃^{Lys} unter Zusammenfassung aller erarbeiteten Informationen: pCCCCGGAUAm²GCUCAGDCGGDAGAGCAΨ-CAGACUSUUXAΨCUGAGGm⁷Gm⁵Cm⁵CAGGGTm/CAm¹AGUCCUGUUCGGGCGCCA^{OH}.

Die Abbildung 25 zeigt, daß tRNA₃^{Lys} aus Kaninchenleber, ebenso wie alle anderen bisher sequenzierten tRNAs, als Kleeblatt dargestellt werden kann:

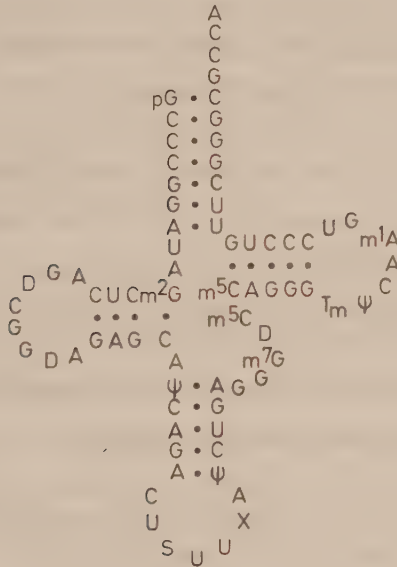


Abb. 25: Sekundärstruktur von Kaninchenleber-tRNA₃^{Lys}

3.7. Zusammenstellung der Ergebnisse aus der Sequenzanalyse von tRNA₃^{Lys} aus Kaninchenleber

Die sequenzierte tRNA₃^{Lys} aus Kaninchenleber besteht aus 76 Nukleotiden. Neben den vier normalen Nukleosiden Adenosin, Cytidin, Uridin und Guanosin sind vierzehn seltene Nukleoside Bestandteil dieser tRNA: N²- Monomethylguanosin, dreimal Pseudouridin, 2-Thio-5-carboxymethyluridinmethylester, das hochmodifizierte Purinderivat X von unbekannter Struktur (28), N⁷- Methylguanosin, zweimal 5- Methylcytidin, 2'O-Methylribothymidin und 1- Methyladenosin.

Zwei der vierzehn seltenen Nukleoside wurden bisher in der Literatur nicht beschrieben: 2'O- Methylribothymidin und das hochmodifizierte Purinderivat X.

Mit der Strukturaufklärung von 2'O- Methylribothymidin konnte zum erstenmal die Beteiligung dieses seltenen Nukleosids am Aufbau einer Nukleinsäure gezeigt werden.

Die in fast allen tRNAs vorkommende Ribosomenbindungssequenz GT~~T~~C ist in dieser tRNA durch GTm~~T~~C ersetzt.

Die Methylierung in der 2'- Position des Thymidins beeinträchtigt die Aktivität dieser tRNA in der Proteinbiosynthese nicht. Kaninchenleber - tRNA₃^{Lys} ist aktiv bei der PolyA- und Poly(AAG)- abhängigen Polylysinsynthese in zellfreien Extrakten aus E. coli und der Globin- mRNA- abhängigen Pro-

teinbiosynthese in zellfreien Extrakten aus Asciteszellen der Maus (54). Dabei konnte beobachtet werden, daß $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ das Codon AAA gegenüber AAG bevorzugt.

Das hochmodifizierte Purinderivat X schließt direkt an das 3'-Ende des Anticodons SUU an und nimmt damit eine Position ein, die in vielen tRNAs von stark modifizierten Purinen besetzt wird.

Eine weitere Besonderheit zeigt diese tRNA durch die Anwesenheit des Oligonukleotids UUCG im Akzeptorstamm, das in den bisher sequenzierten tRNAs nur in der T Ψ C-Schleife gefunden worden ist.

3.8. Sequenzstudien zu den minoren Lysin- tRNA- Spezies nach Säulenchromatographien an DEAE- Sephadex A-50 und RPC-5

Die aus einer Säulenchromatographie über DEAE- Sephadex A-50 isolierte minore lysinakzeptierende Spezies (vgl. Abb. 2) wurde von Frl. E. Stephens in mehreren Schritten gereinigt und erhielt die Bezeichnung $\text{tRNA}_{3A}^{\text{Lys}}$.

Bei der letzten Säulenchromatographie zur Reinigung von $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ an RPC-5 trat neben der Hauptspezies eine weitere Lysin- tRNA auf, welche die Bezeichnung $\text{tRNA}_{3B}^{\text{Lys}}$ erhielt (vgl. Abb. 4). Erste Untersuchungen zeigten, daß diese Spezies für eine Sequenzanalyse noch nicht rein genug war. Es war somit ein weiterer Reinigungsschritt nötig; dazu diente eine Hoch-

drucksäulenchromatographie an BD- Zellulose.

Die beiden lysinakzeptierenden Spezies $\text{tRNA}_{3A}^{\text{Lys}}$ und $\text{tRNA}_{3B}^{\text{Lys}}$ wurden mit Ribonuklease T_1 bzw. Ribonuklease A gespalten und danach mit alkalischer Phosphatase behandelt. Nach 5'-Markierung der entsprechenden Oligonukleotide mit $\gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ wurde eine zweidimensionale Hochspannungselektrophorese ausgeführt. Die entsprechenden Autoradiographien von $\text{tRNA}_{3A}^{\text{Lys}}$ (Abb. 26, 27) waren identisch mit denen von $\text{tRNA}_{3B}^{\text{Lys}}$.

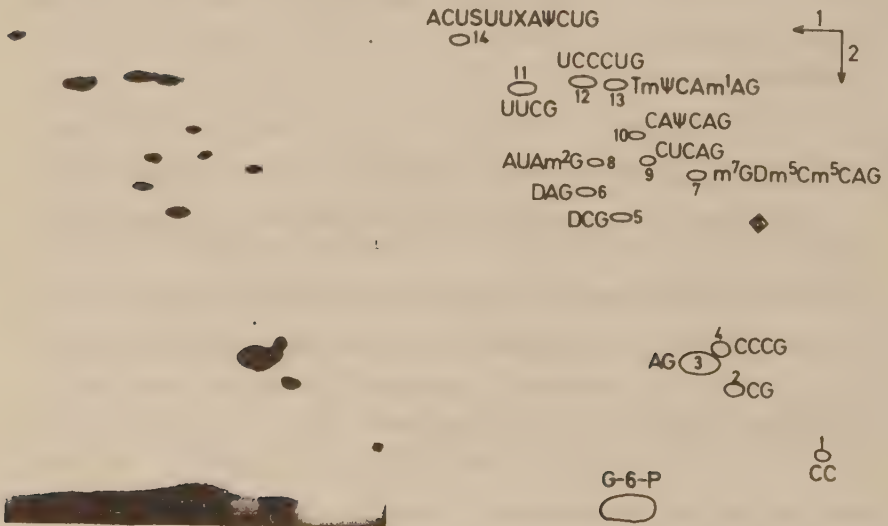


Abb. 26: "Fingerprint" von $\text{tRNA}_{3A}^{\text{Lys}}$ nach Behandlung mit Ribonuklease T_1 und anschließender 5'-Phosphorylierung der resultierenden Oligonukleotide mit $\gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$.

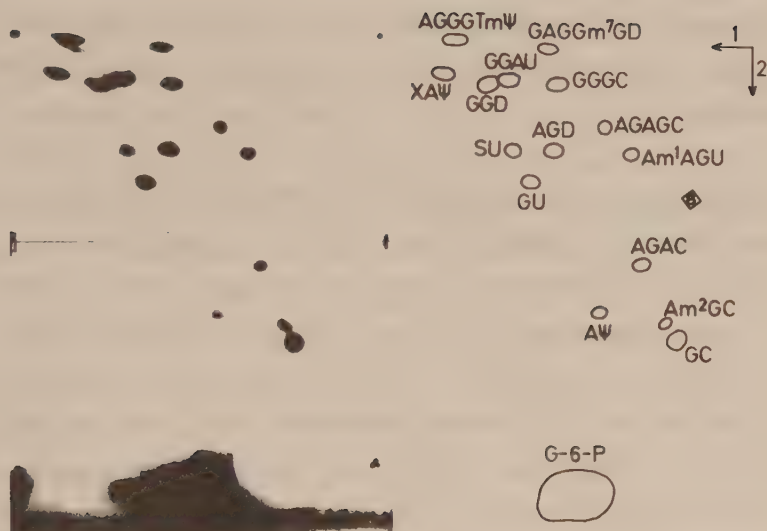


Abb. 27: Autoradiographie von $\text{tRNA}_{3\text{A}}^{\text{Lys}}$ nach zweidimensionaler Hochspannungselektrophorese der mit Ribonuklease A behandelten tRNA mit nachfolgender 5'-Markierung der Oligonukleotide mittels $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$.

Gegenüber den "fingerprints" von $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ (vgl. Abb. 17 und Ref. 28) wiesen die Spaltmuster von $\text{tRNA}_{3\text{A}}^{\text{Lys}}$ und $\text{tRNA}_{3\text{B}}^{\text{Lys}}$ nur eine einzige Abweichung auf. Es fehlte das Trinukleotid $^{32}\text{pCCA}$; statt dessen konnte das Dinukleotid ^{32}pCC identifiziert werden, welches im "fingerprint" von $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ nicht vorhanden war.

Alle anderen Ribonuklease T_1 - und Ribonuklease A- Fragmente

aus $\text{tRNA}_{3A}^{\text{Lys}}$ und $\text{tRNA}_{3B}^{\text{Lys}}$ wurden mit Schlangengiftphosphodiesterase nach den unter 5.2.13 beschriebenen Methoden sequenziert. Es konnten keine weiteren Unterschiede zu $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ gefunden werden.

Somit ist gezeigt, daß $\text{tRNA}_{3A}^{\text{Lys}}$ und $\text{tRNA}_{3B}^{\text{Lys}}$ identisch und Abbauprodukte von $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ sind, die in vivo oder während der Reinigungsprozesse das terminale Adenosin verloren haben. Aminoacylierungsversuche zeigten, daß beide Spezies trotz des fehlenden 3'-terminalen Adenosins mit Lysin beladen werden konnten, weil in unserer Enzympräparation auch die tRNA-Nukleotidyltransferase anwesend ist, welche vor der eigentlichen Aminoacylierungsreaktion das fehlende Adenosin anheftet.

3.9. Sequenzierung einer weiteren lysinspezifischen tRNA

Die Arbeiten von Ortwerth und Mitarbeitern (24,25) ließen es interessant erscheinen, die lysinspezifische tRNA zu sequenzieren, die mit der Zellteilung assoziiert ist.

Zuerst wurde versucht, diese Spezies ($\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$) aus Kalbsmilz zu isolieren. Die gesuchte tRNA konnte zwar nachgewiesen werden; es war aber sehr bald offensichtlich, daß die Versuche mit Kalbsmilz-tRNA nicht den gewünschten Erfolg bringen würden. Der Anteil an $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$ war so gering, daß es unmöglich gewesen wäre, eine ausreichende Menge für Sequenzstudien

zu präparieren. Deshalb wurde tRNA aus den sich äußerst rasch teilenden Mäuse- Mastoma P815- Zellen isoliert, die in Suspension gezüchtet worden waren. Nach zahlreichen Versuchen konnte eine tRNA- Präparation isoliert werden, die $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$ in höherer Konzentration enthielt und durch Wahl geeigneter Chromatographiebedingungen von den anderen lysinakzeptierenden Spezies abgetrennt werden konnte (Abbildung 28).

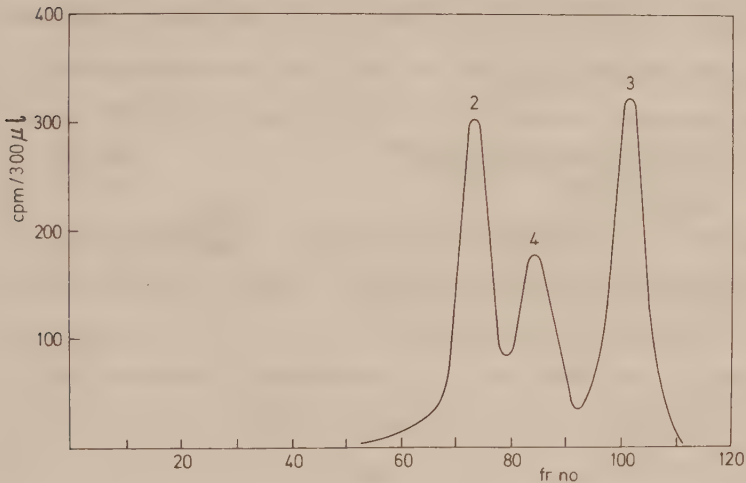


Abb. 28: Fraktionierung von Mäuse- Mastoma- P815- tRNA im analytischen Maßstab an RPC-5 (2 A_{260} - Einheiten tRNA, mit ^3H - Lysin aminoacyliert und 50 A_{260} - Einheiten unfraktionierter Kaninchenleber- tRNA als Träger). Säulenabmessungen: 200 x 1,5 cm. Druck: 2-3 kp/cm^2 ; Tropfgeschwindigkeit: 3 Sekunden pro Tropfen. Das Fraktionsvolumen betrug 15 ml. Eluiert wurde mit einem linearen Kochsalzgradienten von

0,45 M NaCl (1600 ml) bis 0,75 M NaCl (1600 ml) in 0,01 M Natriumacetat pH 4,5 und 0,01 M MgCl_2 . Die Auswertung des Experiments erfolgte durch Messung der Radioaktivität im Scintillationszähler. Die Bezeichnungen $\text{tRNA}_2^{\text{Lys}}$ und $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ sind entsprechend der Abb. 2. Die Bezeichnung $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$ erfolgte in Anlehnung an die Arbeiten von Ortwerth und Mitarbeitern (24,25).

Zur Gewinnung größerer Mengen tRNA wurden die Mäuse- Mastoma-P815- Zellen in die Bauchhöhle von Mäusen injiziert, um sie nach sieben Tagen zu ernten. Das stark verlangsamte Wachstum in vivo, verglichen mit der Zellkultur, bewirkte jedoch eine zu starke Abnahme an $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$.

Nachdem ein weiterer Versuch mit L5178Y- Mäuse- Leukämie-Zellen ebenfalls nicht die benötigten $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$ - Mengen liefern konnte wurde dies in Zusammenarbeit mit Dr. Jon R. Katze vom Department of Microbiology and Biochemistry, University of Southern California School of Medicine (Los Angeles , California) erreicht.

Aus SVT2- Zellen (SV 40 transformierte BALB/C-3T3- Mäuse-Fibroblasten) isolierte J.R. Katze, ausgehend von 1512 A_{260} - Einheiten unfraktionierter tRNA, in fünf Reinigungsschritten 0,37 A_{260} - Einheiten reine $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$ mit einer Akzeptoraktivität von 1800 pM Lysin pro A_{260} - Einheit. Nach J.R. Katze war diese tRNA chromatographisch identisch mit der von uns isolierten und der von Ortwerth beschriebenen $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$.

3.9.1. Spaltung von SVT2- tRNA^{Lys}₄ mit Ribonuklease T₁ und Ribonuklease A

Jeweils 0,05 A₂₆₀- Einheiten tRNA^{Lys}₄ wurden mit Ribonuklease T₁ und Ribonuklease A gespalten und anschließend mit alkalischer Phosphatase behandelt. Nach 5'- Markierung der entstandenen Oligonukleotide mit γ -[³²P]- ATP wurde eine zweidimensionale Hochspannungselektrophorese ausgeführt. Die Abbildungen 29 und 30 zeigen die entsprechenden Autoradiographien.

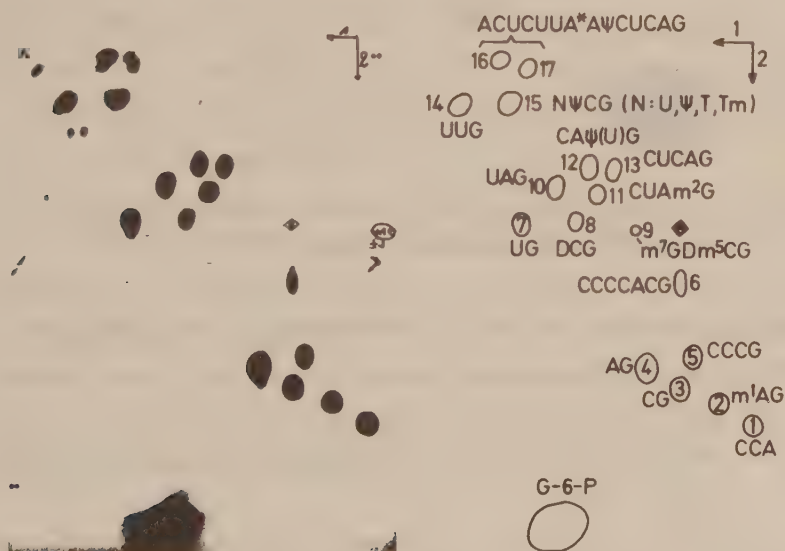


Abb. 29: Autoradiographie einer zweidimensionalen Hochspannungselektrophorese der Ribonuklease T₁- Fragmente von tRNA^{Lys}₄ nach 5'-[³²P]- Markierung der resultierenden Oligonukleotide (1. Dimension: Pyridin/Acetat pH 3,5; 2. Dimension: 7%ige HCOOH).

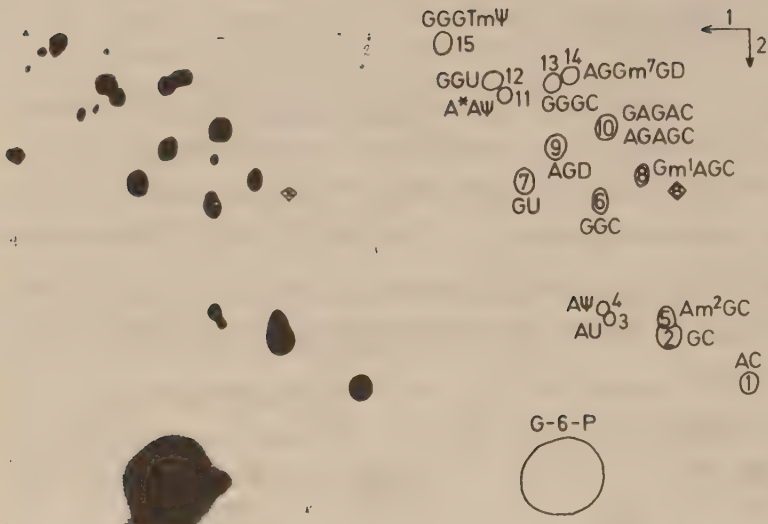


Abb. 30: Autoradiographie der pankreatischen Fragmente von tRNA₄^{Lys} entsprechend Abbildung 29.

Alle radioaktiven Oligonukleotide wurden eluiert und einer weiteren Charakterisierung zugeführt.

3.9.2. Sequenzierung der pankreatischen Fragmente von SVT2-tRNA₄^{Lys}

Die Autoradiographie des pankreatischen Musters zeigte sechzehn verschiedene Oligonukleotide (p 10 enthielt zwei Oligonukleotide). Zuerst wurden die 5'-Endgruppenbestimmungen ausgeführt (vgl. 5.2.13.2). Durch Vergleich mit authentischen Nukleotiden konnten die 5'-terminalen Nukleotide eindeutig

zugeordnet werden.

In zwei Fällen traten Besonderheiten auf:

- (a) Das Nukleotid am 5'- Ende von p 11 (vgl. Abb. 30) war modifiziert und dem N-[9-(β -D-Ribofuransyl)-purin-6-yl-carbamoyl]-L-threonin ähnlich, das in tRNA₂^{Lys} aus Kainchenleber gefunden wurde (57), jedoch nicht mit diesem identisch.
- (b) Der Fleck p 10 ergab zwei 5'- terminale Endgruppen pG und pA im Verhältnis pG : pA = 1 : 1. p 10 mußte also - auch auf Grund der gemessenen Radioaktivität - zwei Oligonukleotide enthalten.

Zur Aufklärung der Nukleotidsequenzen wurde ein schrittweiser Abbau mit Schlangengiftphosphodiesterase und daran anschließend eine eindimensionale Hochspannungselektrophorese (Pyridin/Acetat pH 3,5) ausgeführt; bei Bedarf wurde eine zweidimensionale Hochspannungselektrophorese/Homochromatographie angewendet (Abbildungen 31-33).

Die Nukleotidsequenzen aus Abbildung 30 wurden unter Anwendung der M- Werte nach F. Sanger (50) eindeutig ermittelt. Als sehr günstig erwies sich die Verwendung der zweidimensionalen Hochspannungselektrophorese/Homochromatographie bei der Analyse von p 10 und p 15 (von p 15 wurde nur die zweidimensionale Hochspannungselektrophorese/Homochromatographie aus-

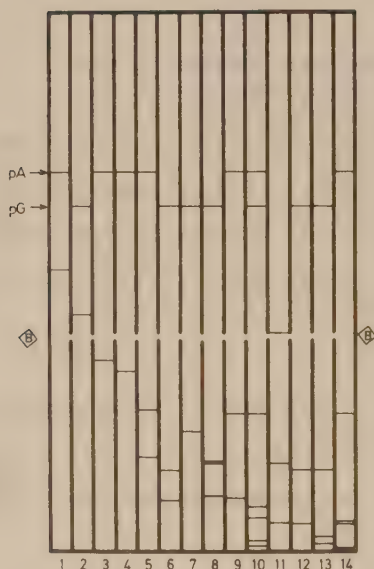


Abb. 31: Spaltmuster der pankreatischen Oligonukleotide p 1 bis p 14 nach kontrollierter Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase und eindimensionaler Hochspannungselektrophorese in Pyridin/Acetat pH 3,5 (16 Stunden bei 500V).

gewertet). Die Abbildung 32 zeigt ein Muster, aus dem die beiden Sequenzen $^{32}\text{pGAGAC}$ und $^{32}\text{pAGAGC}$ eindeutig abgeleitet werden konnten.

Beim pankreatischen Fragment p 15 (Abbildung 33) war der Angriff durch Schlangengiftphosphodiesterase stark gehemmt; dies stimmt mit früheren Beobachtungen überein, wonach die

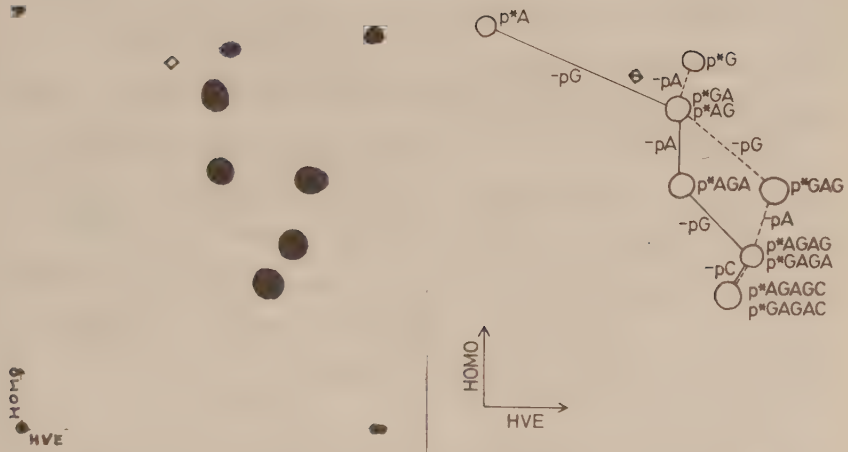


Abb. 32: Zweidimensionale Hochspannungselektrophorese/Homochromatographie des pankreatischen Fragments p 10 nach kontrollierter Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase.



Abb. 33: Zweidimensionale Hochspannungselektrophorese/Homochromatographie von p 15 entsprechend Abb. 32.

Wirkung dieses Enzyms bei Anwesenheit seltener Nukleoside stark behindert ist. Die ersten beiden Abspaltungen sprachen für Uridinderivate. Dies war ähnlich wie bei dem pankreatischen Fragment AGGGTm Ψ in tRNA₃^{Lys} aus Kaninchenleber, dessen 3'- Ende ebenfalls beträchtliche Resistenz gegen Schlangengiftphosphodiesterase aufwies und mit Ribonuklease A zwischen den beiden Uridinderivaten nicht spaltbar war. Aus diesen Hinweisen, sowie weiteren Anhaltspunkten, die bei der Beschreibung der T₁- Oligonukleotide behandelt werden, resultierte für dieses Fragment die Sequenz ³²pGGGU* Ψ .

Die abgeleiteten Sequenzen der pankreatischen Oligonukleotide sind der Tabelle 9 zu entnehmen:

Oligonukleotid (vgl. Abb.30)	Abgeleitete Sequenz
p 1	³² pAC
p 2	³² pGC
p 3	³² pAU
p 4	³² pA Ψ
p 5	³² pAm ² GC
p 6	³² pGGC
p 7	³² pGU

Fortsetzung Tabelle 9

Oligonukleotid (vgl. Abb.30)	Abgeleitete Sequenz
p 8	$^{32}_{\text{pGm}} \text{AGC}$
p 9	$^{32}_{\text{pAGD}}$
p 10	$^{32}_{\text{pGAGAC}} + ^{32}_{\text{pAGAGC}}$
p 11	$^{32}_{\text{pA}^* \text{A}\psi}$
p 12	$^{32}_{\text{pGGU}}$
p 13	$^{32}_{\text{pGGGC}}$
p 14	$^{32}_{\text{pAGGm}} \text{GD}$
p 15	$^{32}_{\text{pGGGU}^* \psi}$

Tabelle 9: Zusammenstellung der pankreatischen Nukleotidsequenzen aus SVT2- $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$. Diese Ergebnisse wurden nach Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase und eindimensionaler Hochspannungselektrophorese erhalten. Die Resultate für p 10 und p 15 stammen aus einer zweidimensionalen Hochspannungselektrophorese/Homochromatographie (vgl. Abbildungen 32 und 33).

3.9.3. Sequenzierung der nach Spaltung mit Ribonuklease T_1 erhaltenen Oligonukleotide von tRNA^{Lys}₄ aus SVT2-Zellen

Es wurden sechzehn verschiedenen Oligonukleotide gefunden und analysiert (vgl. Abb. 29). Erste Ergebnisse erhielt man wieder aus der 5'-Endgruppenbestimmung der einzelnen Fragmente. Neben den seltenen Nukleosiden in T_1 2 (m^1A), T_1 8 (D), T_1 9 (m^7G) und T_1 15 (U, Ψ , T, Tm) wurden nur normale Nukleoside identifiziert. Das Vorliegen von vier verschiedenen 5'-Endgruppen in T_1 15 war ungewöhnlich und unerwartet (s. u.).

Der kontrollierte Abbau mit Schlangengiftphosphodiesterase sollte die Nukleotidfolge in den verschiedenen Oligonukleotiden klären. Die Trennung der entstandenen Abbauprodukte erfolgte durch eindimensionale Hochspannungselektrophorese in Pyridin/Acetat pH 3,5 (Abbildung 34).

Das Fragment T_1 1 konnte eindeutig als $^{32}pCCA$ identifiziert werden, das nach den für tRNA^{Lys}₃ abgeleiteten Überlegungen (vgl. 3.4.2.1) das 3'-Ende dieser tRNA bilden mußte.

T_1 12 ergab nach dem kontrollierten Abbau mit Schlangengiftphosphodiesterase die Sequenz $^{32}pCA\Psi G$, wobei die Hemmung der Spaltung nach Verlust des Guanosin-5'-Monophosphats charakteristisch für Pseudouridin war.

Die pankreatischen Oligonukleotide ^{32}pAU und $^{32}pA\Psi$ im

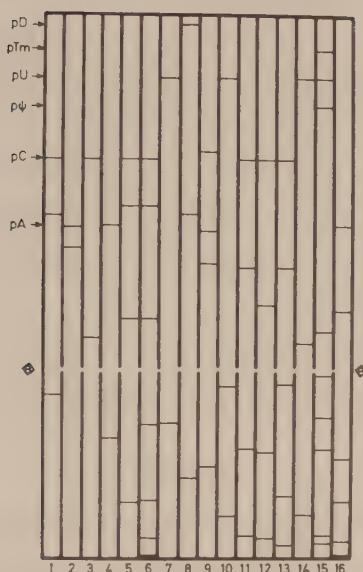


Abb. 34: Schrittweiser Abbau mit Schlangengiftphosphodiesterase der T_1 - Oligonukleotide von $tRNA_4^{Lys}$ aus SVT2- Zellen (T_1 1 - T_1 16); vgl. Abbildung 29.

Verhältnis $^{32}pAU : ^{32}pA\psi = 35 : 65$ (p 3 und p 4) konnten beide nur Bestandteil des T_1 - Oligonukleotids $^{32}pCA\psi G$ sein. Daraus ging hervor, daß T_1 12 nicht homogen war, sondern neben 65% $^{32}pCA\psi G$ noch 35% CAUG vorlagen. Während sich $^{32}pA\psi$ und ^{32}pAU im "fingerprint" trennen (Abb. 30) werden $^{32}pCA\psi G$ und $^{32}pCAUG$ (Abb. 29) nicht getrennt.

Die Sequenzierung von T_1 15 brachte Probleme. Unter Berücksichtigung der Mobilität in der zweidimensionalen Hochspan-

nungselektrophorese (Abb. 29) mußte dieses Fragment zwei Uridine, ein Cytidin sowie ein Guanosin enthalten. Auffallend war die Heterogenität dieses Fragments. Durch Wiederholung des "fingerprints" gelang es nicht diese Heterogenität aufzuheben. Wie oben erwähnt besaß dieses Oligonukleotid neben 2'O- Methylribothymidin noch Thymidin, Pseudouridin und Uridin als 5'- terminales Nukleosid. Mehrere Kontrollversuche mit verschiedenen Ansätzen und authentischen 5'- Mononukleotiden auf der Dünnschichtplatte in den Laufmitteln D und E bewiesen die eindeutige Reproduzierbarkeit dieser Beobachtung.

Der schrittweise Abbau mit Schlangengiftphosphodiesterase mit anschließender eindimensionaler Hochspannungselektrophorese in Pyridin/Acetat pH 3,5 bestätigte die Inhomogenität von T_1 15 (Abb. 34); auch die anderen Abbauprodukte traten stets in Form mehrfacher Banden auf. Um dies zu erklären wurden sämtliche radioaktiven Bereiche durch Elution zurückgewonnen und erneut mit Schlangengiftphosphodiesterase behandelt. Die Parallelsplaltung der authentischen Oligonukleotide $^{32}\text{pU}\cancel{\text{V}}\text{CG}$ und $^{32}\text{p}\cancel{\text{V}}\text{UCG}$ erleichterte die Auswertung erheblich. Diese 5'-[^{32}P]- phosphorylierten Oligonukleotide aus Kaninchenleber- Valin- tRNA wurden freundlicherweise von Herrn Peter Jank aus diesem Labor zur Verfügung gestellt. Die resultierenden Ergebnisse sprachen eindeutig für die vier Sequenzen $\underline{^{32}\text{pU}\cancel{\text{V}}\text{CG}}$, $\underline{^{32}\text{p}\cancel{\text{V}}\text{UCG}}$, $\underline{^{32}\text{pT}\cancel{\text{V}}\text{CG}}$ und $\underline{^{32}\text{pTm}\cancel{\text{V}}\text{CG}}$. Wegen der hohen Reinheit von $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$ (1800 pMol/A₂₆₀- Einheit) war eine

Verunreinigung durch andere tRNAs ausgeschlossen.

Das Verhalten von T_1 16 in der zweidimensionalen Hochspannungselektrophorese ließ auf ein Oligonukleotid mit hoher Kettenlänge schließen. Die 5'- Endgruppenbestimmung lieferte Adenosin und der schrittweise Abbau mit Schlangengiftphosphodiesterase machte eindeutige Aussagen über die ersten Nukleoside des 5'- terminalen Endes: $^{32}\text{pACUCUU}$. Eine zweidimensionale Hochspannungselektrophorese/Homochromatographie klärte die Verhältnisse am 3'- Ende: ... CUCAG. Berücksichtigung des pankreatischen Oligonukleotids $^{32}\text{pA}^*\text{A}\psi$ (p 11) lieferte die Sequenz von T_1 16: $\text{ACUCUUA}^*\text{A}\psi\text{CUCAG}$. In Tabelle 10 sind die Ergebnisse des kontrollierten Abbaues der einzelnen Oligonukleotide mit Schlangengiftphosphodiesterase aufgeführt:

Oligonukleotid (vgl. Abb.29)	Abgeleitete Sequenz
T_1 1	$^{32}\text{pCCA}$
T_1 2	$^{32}\text{pm}^1\text{AG}$
T_1 3	^{32}pCG
T_1 4	^{32}pAG
T_1 5	$^{32}\text{pCCCG}$
T_1 6	$^{32}\text{pCCCCACG}$
T_1 7	^{32}pUG

Fortsetzung Tabelle 10:

Oligonukleotid (vgl. Abb. 29)	Abgeleitete Sequenz
T ₁ 8	³² pDCG
T ₁ 9	³² _{pm} ⁷ G ⁵ Dm ⁵ CG
T ₁ 10	³² pUAG
T ₁ 11	³² pCUAm ² G
T ₁ 12	³² pCA ψ G (65%), ³² pCAUG (35%)
T ₁ 13	³² pCUCAG
T ₁ 14	³² pUUG
T ₁ 15	³² pN ψ CG (N=U, ψ , T, Tm)
T ₁ 16	³² pACUCUUA* A ψCUCAG

Tabelle 10: Ergebnisse der Sequenzanalyse der Ribonuklease T₁-Oligonukleotide aus tRNA^{Lys}₄. Die Nukleotidsequenzen resultierten aus den 5'-Endgruppenbestimmungen und dem schrittweisen Abbau mit Schlangengiftphosphodiesterase (eindimensionale Hochspannungselektrophorese in Pyridin/Acetat pH 3,5 sowie zweidimensionaler Hochspannungselektrophorese/Homochromatographie).

3.9.4. Nukleotidsequenz von tRNA₄^{Lys} aus SVT2- Zellen

Die Sequenzanalyse einer weiteren lysinspezifischen tRNA aus Kaninchenleber (tRNA₂^{Lys}) im hiesigen Laboratorium (57) gestattete wegen ihrer hohen Sequenzhomologien zu tRNA₄^{Lys} die Aufstellung deren Primärstruktur. Die Abbildungen 35 und 36 (auf den Seiten 104/105) zeigen die Ribonuklease T₁- und die pankreatischen Spaltmuster von tRNA₂^{Lys} und tRNA₄^{Lys} nach zweidimensionaler Hochspannungselektrophorese.

Die "fingerprints" der Ribonuklease T₁- Fragmente ließen keinen Unterschied erkennen (vgl. Abb. 35). Bei der Quantitierung und Sequenzierung der einzelnen Oligonukleotide stellte sich heraus, daß tRNA₂^{Lys} ein ³²pAG enthält, während in tRNA₄^{Lys} zwei ³²pAG gefunden wurden. An Stelle von ³²pDAG in tRNA₂^{Lys} (T₁ 9) konnte in tRNA₄^{Lys} die Sequenz ³²pUAG (T₁ 10) identifiziert werden, wobei der Austausch U gegen D in der zweidimensionalen Hochspannungselektrophorese keinen Unterschied in der Mobilität des Oligonukleotids bewirkte.

T₁ 12 in tRNA₂^{Lys} ergab nach der Sequenzanalyse das Oligonukleotid ³²pCAΨG, das in tRNA₄^{Lys} partiell durch ³²pCAUG (T₁ 12) ersetzt ist (³²pCAΨG : ³²pCAUG = 65 : 35).

Die tRNA₂^{Lys} enthielt in T₁ 15 das Tetranukleotid ³²pTmΨCG; wie oben ausgeführt enthielt in tRNA₄^{Lys} der entsprechende Bereich T₁ 15 ³²pTmΨCG, ³²pTVCG, ³²pUΨCG und ³²pVΨCG.

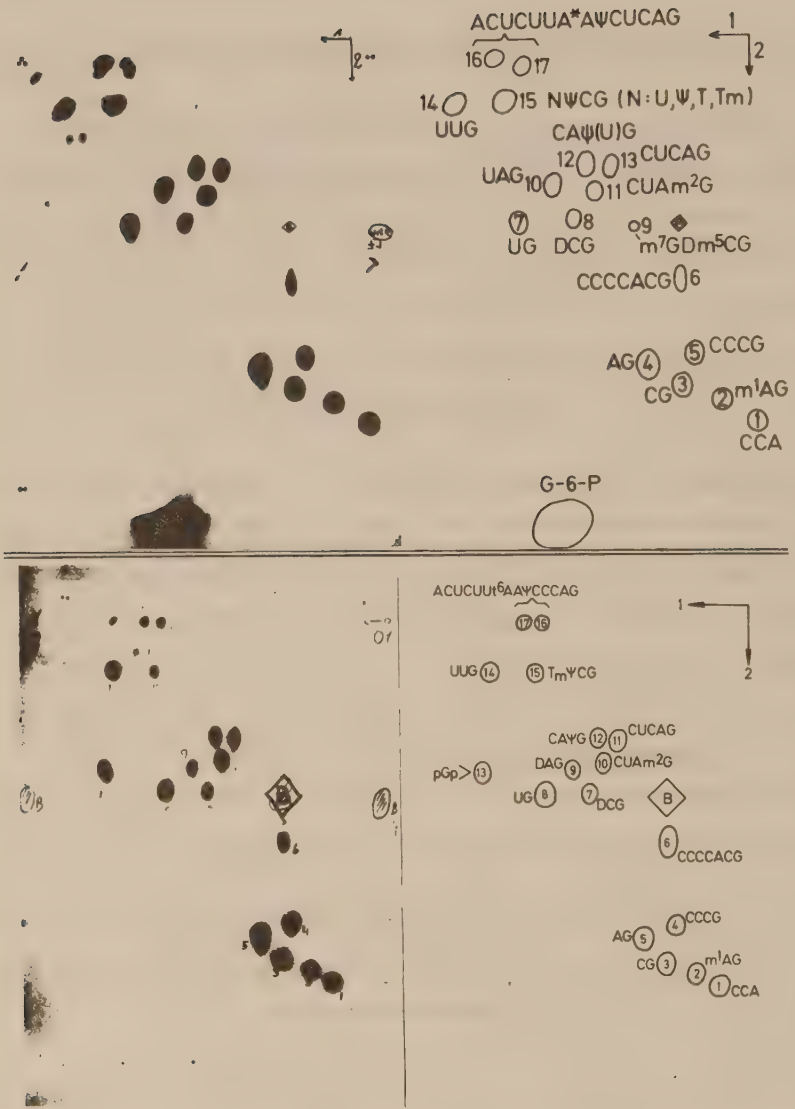


Abb. 35: T₁- Spaltmuster von tRNA^{Lys}₄ aus SVT2- Zellen (oben) und tRNA^{Lys}₂ aus Kaninchenleber (unten).

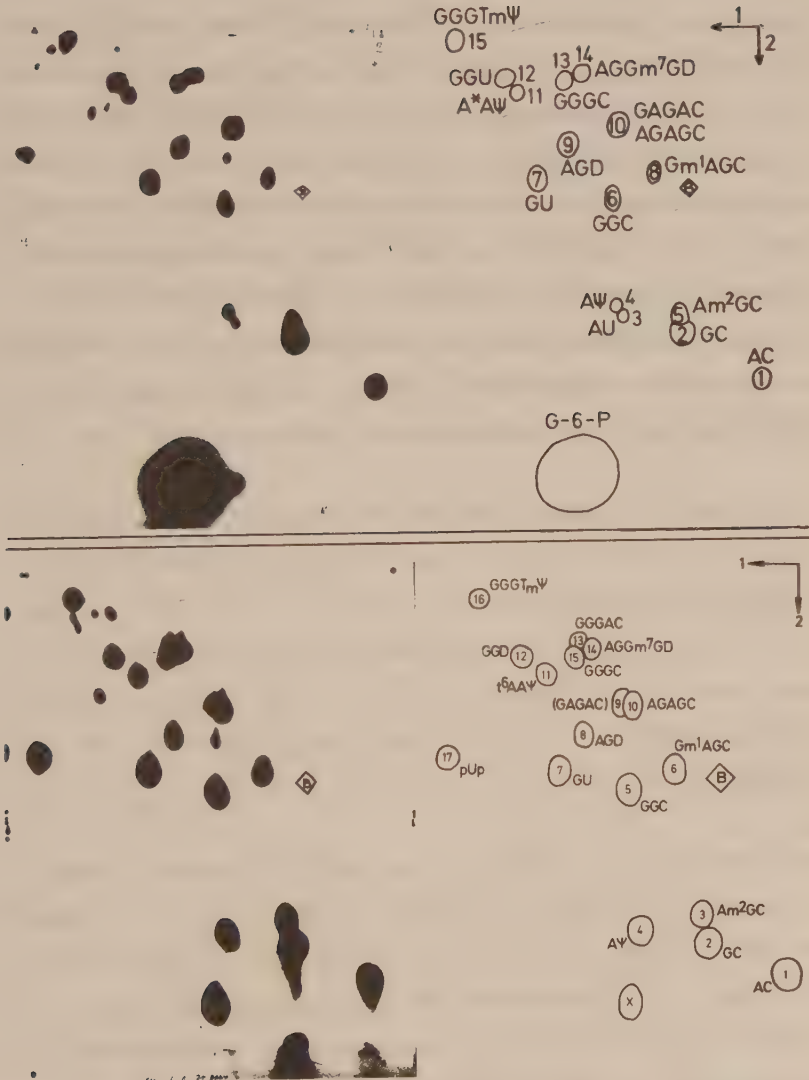


Abb. 36: Pankreatische Spaltmuster von tRNA₄^{Lys} aus SVT2- Zellen (oben) und tRNA₂^{Lys} aus Kaninchenleber (unten).

Ein weiterer Unterschied zwischen $\text{tRNA}_2^{\text{Lys}}$ und $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$ zeigte sich deutlicher in den pankreatischen Spaltmustern. Während die 5'-Endgruppenbestimmung für p 11 in $\text{tRNA}_2^{\text{Lys}}$ (Abb. 36, unten) eindeutig N-[9-(β -D-Ribofuranosyl)-purin-6-yl-carbamoyl]-L-threonin (t^6A) ergab, konnte im entsprechenden Fragment p 11 aus $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$ (Abb. 36, oben) dieser Beweis nicht positiv geführt werden. Die ähnlichen Mobilitäten der entsprechenden Fragmente in der zweidimensionalen Hochspannungselektrophorese lassen jedoch darauf schließen, daß A^* in $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$ mit t^6A sehr nahe verwandt sein muß.

Ein charakteristischer Unterschied zeigte sich bei den pankreatischen Dinukleotiden. Neben $^{32}\text{pAV}\Psi$ war in $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$ auch ^{32}pAU bestimmt worden (Abb. 36, oben; p 4 bzw. p 3); dieser Befund drückte sich in der oben erwähnten partiellen Untermodifizierung von $^{32}\text{pCAV}\text{G}$ als $^{32}\text{pCAUG}$ aus. Im entsprechenden "fingerprint" von $\text{tRNA}_2^{\text{Lys}}$ wurde nur $^{32}\text{pAV}\Psi$ (Abb. 36, unten) gefunden.

Bemerkenswert war das Fehlen der $\text{tRNA}_2^{\text{Lys}}$ -Sequenz $^{32}\text{pGGGAC}$ (Abb. 36, unten; p 13) in $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$. $^{32}\text{pGGGAC}$ sollte in $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$ zwischen $^{32}\text{pGGGC}$ (Abb. 36, oben; p 13) und $^{32}\text{pAGGm}^7\text{GD}$ (Abb. 36, oben; p 14) lokalisiert sein; dieser Bereich wies in $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$ keine Radioaktivität auf. Anstelle dieses Pentanukleotids wurde in $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$ das Fragment $^{32}\text{pGAGAC}$ (Abb. 36, oben; p 10) gefunden, welches in $\text{tRNA}_2^{\text{Lys}}$ neben $^{32}\text{pGGGAC}$ nur zu ca. 25% nachgewiesen werden konnte (Abb. 36, unten; p 9). Die

Existenz von $^{32}\text{pGAGAC}$ in $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$ wirkte sich im entsprechenden T_1 -Muster durch die Anwesenheit von zwei Mol ^{32}pAG gegenüber einem Mol ^{32}pAG in $\text{tRNA}_2^{\text{Lys}}$ aus. Das identische 3'-Ende ...AC bewies, daß $^{32}\text{pGAGAC}$ in $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$ nur anstelle von $^{32}\text{pGGGAC}$ vorliegen konnte, da kein weiteres Fragment gefunden wurde, das mit dem 5'-Ende ^{32}pAC ... von T_1 16 hätte überlappen können. Die Änderung von $^{32}\text{pGGGAC}$ zu $^{32}\text{pGAGAC}$ drückte sich auch in einem vollkommenen Pyrimidinaustausch von C nach U des im Anticodonstamm gegenüberliegenden gepaarten Nukleotids aus (Abbildung 37). Über die Bedeutung dieses Austausches

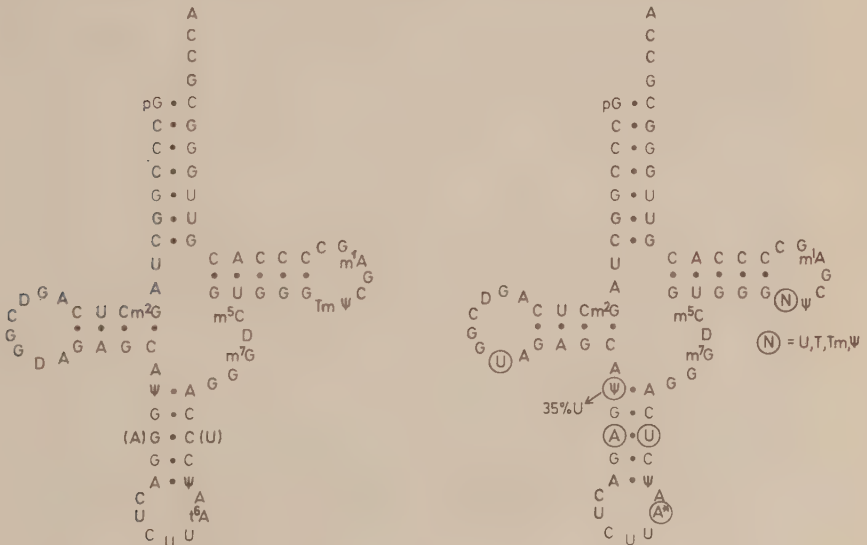


Abb. 37: Nukleotidsequenzen von $\text{tRNA}_2^{\text{Lys}}$ aus Kaninchenleber (57) (links) und $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$ aus SVT2- Zellen (rechts). Die in $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$ von $\text{tRNA}_2^{\text{Lys}}$ abweichenden Positionen sind eingekreist.

$^{32}\text{pGGGAC}$ zu $^{32}\text{pGAGAC}$ wird in der Diskussion zu sprechen sein.

Wie aus der Abbildung 37 ersichtlich wird, unterscheiden sich $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$ aus SVT2- Zellen und die Hauptspezies von $\text{tRNA}_2^{\text{Lys}}$ in sechs Positionen, wobei eine von mehreren Uridinderivaten eingenommen werden kann (T^ψC- Schleife).

4. Diskussion

Für jede Aminosäure sollte im Organismus mindestens eine spezifische tRNA vorkommen; es wurden jedoch mehrere Spezies (Isoakzeptoren) gefunden. Man spricht daher von tRNA-Multiplizität. Eine Erklärung dafür ist die Degeneration des genetischen Codes: Für ein gegebenes Codon sind nicht alle drei Buchstaben des entsprechenden Anticodons gleichwertig, sondern es wird in der 3. Position des Codons mit wenigen Ausnahmen nur noch zwischen Purin und Pyrimidin unterschieden. Die Bedeutung dieser Gesetzmäßigkeit erklärt Crick mit seiner "Wobble"-Hypothese (58). Sie erweitert z.B. beim Inosin (in der 1. Position des Anticodons) die Möglichkeit zur Basenpaarung mit U, C oder A in der 3. Position des Codons.

Die hohe Multiplizität verschiedener tRNA-Spezies ist nicht allein mit der Degeneration des genetischen Codes zu erklären, die nur eine gewisse Variabilität innerhalb des Anticodons möglich macht. Zahlreiche Arbeiten der letzten Jahre berichten von isoakzeptierenden tRNAs, die sich in der Primärstruktur mehr oder weniger unterscheiden (11, 59, 60); man spricht dann von Sequenzmultiplizität.

Ein besonders interessanter Fall von Sequenzmultiplizität sind die Suppressor-tRNAs: Mutation des Wildtypgens (su_0^-) z.B. von $tRNA_1^{Tyr}$ aus E. coli bewirkt eine Änderung des Anticodons der resultierenden $tRNA_1^{Tyr}$ von GUA zu CUA.

Diese veränderte su_3^+ Tyrosin-tRNA wirkt als "amber"-Suppressor, da sie das Kettenterminationscodon UAG ("amber") erkennt und durch den Einbau von Tyrosin an dieser Stelle den Kettenabbruch bei der Proteinbiosynthese aufhebt (61).

Zu erwähnen sind in diesem Zusammenhang auch solche tRNA-Spezies, die sich durch Hypo- bzw. Hypermodifikationen unterscheiden (60). Schließlich wird die Zahl der isoakzeptierenden tRNAs in einem höheren Organismus dadurch erhöht, daß zu den cytoplasmatischen noch die mitochondrialen tRNAs kommen (62, 63).

Bemühungen, die Multiplizität der tRNA-Populationen mit anderen Funktionen als der Proteinbiosynthese zu erklären, führten in den letzten Jahren zu interessanten Beobachtungen. Es wurde nämlich gefunden, daß tRNAs an einer ganzen Reihe von biologischen Vorgängen beteiligt sind, die mit ihrer normalen Funktion bei der Proteinsynthese nichts zu tun haben. Einige dieser Prozesse sollen im folgenden aufgezählt werden:

- (a) In *Staphylococcus epidermidis* existieren vier glycinspezifische tRNAs (64-67), die zur Peptidoglykansynthese in der Zellwand herangezogen werden können; davon sind jedoch nur zwei in der Lage, sich an der Proteinbiosynthese zu beteiligen. R.J. Roberts (68) sequenzierte diese beiden Spezies ($tRNA_{IA}^{Gly}$ und $tRNA_{IB}^{Gly}$), die nur bei der Zellwandsynthese aktiv sind; charakteristischer Unterschied zu den normalen tRNAs ist hier die Abwesenheit

der Ribosomenbindungssequenz GTTC und ihr Ersatz durch GUGC. Diese tRNAs können daher nicht an Ribosomen binden und zur Proteinbiosynthese beitragen.

- (b) Lysin- und alaninspezifische tRNAs bewirken den ribosomenunabhängigen Aminosäureeinbau bei der Bildung von o-Lysyl (alanyl)-phosphatidylglycerol in *Clostridium welchii*, das als Bestandteil der inneren und äußeren Zellmembran identifiziert wurde (69-71).
- (c) Eine bemerkenswerte Beobachtung machten Novelli et al. (72), die zeigen konnten, daß an fertige, bereits von den Ribosomen abdissoziierte Proteine am Aminoende durch tRNAs noch Aminosäuren inkorporiert werden können.
- (d) B. Ames berichtete 1972 über die Beteiligung einer Histidin-tRNA an der Regulation der Biosynthese von Histidin (73). Danach reguliert die Histidyl-tRNA^{His} die Expression des Histidin-Operons bei *Salmonella typhimurium*.
- (e) Neben der Synthese von Antikörpern gegen eingedrungene Antigene existiert in der Zelle durch die spezifische Bildung von Interferon ein weiterer Abwehrmechanismus. Es konnte gezeigt werden, daß tRNAs aus Eukaryonten an der Aufhebung der Interferon-induzierten Hemmung der Translation viraler mRNA beteiligt sind (74).
- (f) Die Initiation der DNA-Synthese in vitro bei Rous Sar-

koma-Virus infizierten Zellen benötigt einen Starter ("primer") für die reverse Transkriptase (75,76), der an der 70s RNA des Virus anhybridisiert vorliegt und als eine 4S RNA charakterisiert wurde. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß es sich bei den Experimenten von Dahlberg (77,78) um eine Tryptophan-tRNA handelt; auch für tRNA^{Met} und tRNA^{Pro} konnten entsprechende Eigenschaften nachgewiesen werden.

J.E. Dahlberg sequenzierte diese tRNA und fand bemerkenswerte Strukturmerkmale; besonders interessant ist die Ribosomenbindungssequenz, die bei dieser Spezies nicht wie üblich GTVC, sondern GΨC ist (79). Waters und Mitarbeiter konnten mit ihren Arbeiten über RSV-infizierte Hühnerzellen diesen Sachverhalt eindeutig bestätigen (26). Die Beobachtungen beziehen sich nicht nur auf RS- sondern auch auf AM-Viren. Bei letzteren wurde von Waters et al. eine Hybridisierung von tRNA^{Lys} an die AMV-35S RNA gefunden (27). Die Lysin-tRNA ihrer Versuchsanordnung entspricht mit Sicherheit der tRNA₂^{Lys} aus Kaninchenleber, die im hiesigen Laboratorium sequenziert wurde. Wichtig dabei ist, daß die tRNA₂^{Lys} nicht einheitlich ist (tRNA_{2A}^{Lys}, tRNA_{2B}^{Lys}). Für tRNA₂^{Lys} konnte die Sequenz von GΨC nicht nachgewiesen werden. Wie Yang zeigen konnte, besitzt diese tRNA zwar die Eigenschaft mit der 35S RNA zu hybridisieren, kann jedoch keine Starterfunktion für die reverse Transkriptase übernehmen.

Berücksichtigt man bei diesen Aussagen die vorliegenden Ergebnisse bezüglich der isoakzeptierenden Lysin-tRNAs aus

Kaninchenleber und SVT2-Zellen, so ergeben sich interessante Übereinstimmungen.

H.J. Gross (57) verglich die "fingerprints" der Ribonuklease T_1 - und Ribonuklease A-Fragmente von Kaninchenleber tRNA^{Lys}₂ mit den entsprechenden aus SVT2-Zellen. Dabei konnte Identität gefunden werden; dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von G. Dirheimer (80) sowie M. Simsek und U.L. RajBhandary (81), die für gleiche tRNA-Spezies aus Eukaryonten verschiedenen Ursprungs übereinstimmende Nukleotidsequenzen nachweisen konnten.

Die Identifizierung der Sequenz GΨΨC in tRNA^{Lys}₄ aus SVT2-Zellen eröffnet interessante Aspekte. Die Beobachtungen von Ortwerth et al. (24,25) lassen eine direkte Beteiligung der tRNA^{Lys}₄ an der Regulation der Zellteilung möglich erscheinen. tRNA^{Lys}₄ leitet sich von tRNA^{Lys}_{2B} ab, die äußerst enge Primärstrukturverwandtschaft mit tRNA^{Lys}_{2A} aufweist (s.u.), welche beide mit der 35S RNA von AM-Viren hybridisieren können (27). Daneben enthält die tRNA^{Lys}₄ die charakteristische Sequenz GΨΨC, die bisher nur bei solchen tRNA-Molekülen nachgewiesen werden konnte, die als Starter für die reverse Transkriptase dienen können.

(g) Ortwerth und Mitarbeiter beschäftigten sich mit isoakzeptierenden Lysin-tRNAs aus verschiedenen Organismen

und machten dabei eine interessante Entdeckung (24,25). Sie konnten zeigen, daß in sich teilenden Zellen eine lysinspezifische tRNA existiert ($\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$), deren Menge annähernd linear mit der Zellteilungsrate korreliert ist; Zellen, die sich nicht teilen, enthalten keine $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$. Diese Beobachtungen gaben den Impuls für die Sequenzanalyse dieser LysintRNA.

Als herausragendes Ergebnis ist dabei die Heterogenität der Ribosomenbindungssequenz anzusehen. Vier unterschiedliche Sequenzen ($\text{U}\psi\text{CG}$, $\text{T}\psi\text{CG}$, $\text{Tm}\psi\text{CG}$, $\psi\psi\text{CG}$) wurden identifiziert, die sich nur am 5'-terminalen Ende unterscheiden.

Vergleicht man die Primärstrukturen von $\text{tRNA}_2^{\text{Lys}}$ und $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$, so stellt man fest, daß nahezu alle Unterschiede in $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$ auf Hypomodifikationen der letzteren zurückzuführen sind: $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$ enthält UAG bzw. CAUG gegenüber DAG bzw. $\text{CA}\psi\text{G}$ in $\text{tRNA}_2^{\text{Lys}}$. Das erste Nukleosid der Ribosomenbindungsschleife weist die auffallendsten Merkmale auf: Während $\text{tRNA}_2^{\text{Lys}}$ dort 2'-O-Methylribothymidin (Tm) enthält, findet man in $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$ U, T, Tm und ψ an dieser Stelle; daraus kann der Syntheseweg von 2'-O-Methylribothymidin in vivo abgelesen werden: Aus dem ursprünglichen Uridin wird zunächst Ribothymidin und in einem zweiten Schritt erfolgt die Methylierung an der 2'-Hydroxylgruppe der Ribose zum 2'-O-Methylribothymidin; ein anderer Weg führt vom Uridin zum Pseudouridin (Abb. 38), woraus die Sequenz $\text{G}\psi\text{C}$ resultiert, die bisher nur in den tRNAs gefunden wurde, die als Starter für die reverse Transkriptase von

RNA-Tumurviren dienen (75,76).

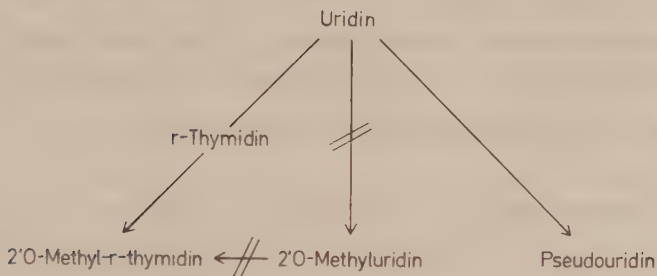


Abb. 38: Biosynthese von 2'O-Methylribothymidin bzw. Pseudouridin in Position 23 vom 3'-Ende von Lysin-tRNA.

Die Untermodifizierungen in $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$ lassen für das dem 3'-Ende des Anticodons benachbarte Adenosinderivat vermuten, daß es eine noch unbekannte biosynthetische Vorstufe des N- [9- (β -D-Ribofuranosyl)-purin-6-yl-carbamoyl] -L-threonin (t^6A) ist.

Damit ist auch schon die in der Einleitung dieser Arbeit gestellte Frage geklärt, ob $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$ das Produkt eines eigenen Gens ist, oder ob sie von einer anderen Spezies abgeleitet werden kann. Wie unter 3.9.4. beschrieben, ist $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$ mit einer der beiden $\text{tRNA}_2^{\text{Lys}}$ sequenzgleich ($\text{tRNA}_{2\text{B}}^{\text{Lys}}$), nämlich mit derjenigen Spezies, die im Anticodonstamm GAGAC statt GGGAC enthält. $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$ ist somit nicht Produkt eines eigenen Gens,

sondern stellt ein Gemisch von ("unreifen") $\text{tRNA}_{2\text{B}}^{\text{Lys}}$ -Vorstufen dar, die offensichtlich dadurch entstehen, daß die tRNA-modifizierenden Enzyme bei hoher Zellteilungsrate nicht Schritt halten können mit der gesteigerten tRNA-Synthese, bzw. daß im Fall der $\Psi\Psi\text{CG}$ -Sequenz ein neuer Modifikationsweg eingeschlagen wird.

- (h) Die Sequenzstudien von $\text{tRNA}_{3\text{A}}^{\text{Lys}}$ und $\text{tRNA}_{3\text{B}}^{\text{Lys}}$ aus Kaninchenleber zeigen die Problematik isoakzeptierender tRNAs. Im Elutionsprofil verschiedener Säulenchromatographien weisen sich $\text{tRNA}_{3\text{A}}^{\text{Lys}}$ und $\text{tRNA}_{3\text{B}}^{\text{Lys}}$ als Isoakzeptoren aus. Die Sequenzanalyse zeigte jedoch, daß es sich um identische Abbauprodukte von $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ handelt, die in vivo oder während der Aufarbeitung das terminale Adenosin verloren haben. Somit waren $\text{tRNA}_{3\text{A}}^{\text{Lys}}$ und $\text{tRNA}_{3\text{B}}^{\text{Lys}}$ keine eigenständigen isoakzeptierenden Lysin-tRNAs.

Mit der Strukturaufklärung von 2'-O-Methylribothymidin in $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ aus Kaninchenleber (41) wurde dieses seltene Nukleosid zum erstenmal als Bestandteil von Nukleinsäuren nachgewiesen. Wie die Ergebnisse der Sequenzanalyse zeigen, ist 2'-O-Methylribothymidin im pankreatischen Oligonukleotid $\text{AGGGTm}\Psi$ und der T_1 -Sequenz $\text{Tm}\Psi\text{CAm}^1\text{AG}$ enthalten. Die Überlappung dieser beiden enzymatischen Hydrolyseprodukte und ihre Einordnung in die Gesamtsequenz lokalisieren 2'-O-Methylribothymidin in der Ribosomenbindungssequenz $\text{GTm}\Psi\text{C}$.

Die Resistenz des Dinukleosidmonophosphats Tmp Ψ gegenüber dem Angriff von Ribonuklease A und Ribonuklease T₂ erklärt sich aus der Methylierung an der 2'-Hydroxylgruppe von Ribothymidin. Die enzymatische Spaltung einer Phosphodiesterbindung verläuft über ein zyklisches 2'-, 3'-Phosphat, welches durch Ringöffnung spezifisch zum 3'-Phosphat gespalten wird. Wegen der Methylierung der 2'-Hydroxylgruppe beim 2'-O-Methylribothymidin ist die Ausbildung der zyklischen Phosphatzwischenstufe nicht möglich. Eine Spaltung von Tmp Ψ in Nukleosid und Nukleotid ist deshalb mit solchen Nukleasen unmöglich, die ein freies 2'-OH benötigen.

Die Anwesenheit von 2'-O-Methylribothymidin konnte später auch in den Spezies tRNA₂^{Lys} aus Kaninchenleber und tRNA₃^{Lys} aus Rattenleber (57) sowie tRNA₄^{Lys} aus SVT2-Zellen nachgewiesen werden (s.o.).

Proteinbiosyntheseversuche im in vitro-System mit Poly A und Poly (AAG) zeigten eindeutig, daß 2'-O-Methylribothymidin keinen Einfluß auf die Proteinbiosyntheseaktivität von tRNA₂^{Lys} und tRNA₃^{Lys} aus Kaninchenleber ausübt. Bei tRNA₃^{Lys} wird das Codon AAA gegenüber AAG bevorzugt, während tRNA₂^{Lys} und tRNA₄^{Lys} nur das Codon AAG erkennen (54).

Ein weiteres, bisher nicht beschriebenes seltenes Nukleosid X, das am 3'-Ende des Anticodons von tRNA₃^{Lys} aus Kaninchenleber vorliegt, konnte bisher nicht eindeutig charakterisiert werden (28). Mehrere Befunde sprechen jedoch dafür,

daß es sich um ein hochmodifiziertes Purinderivat handelt.

Im hiesigen Labor ist gezeigt worden, daß die Lysin-tRNAs aus Kaninchenleber und *E. coli* alle sowohl von Synthetasen aus Leber als auch aus *E. coli* gleich gut mit Lysin beladen werden (82). Die gemeinsamen Erkennungsmerkmale für die lysinspezifischen Synthetasen sollten also sowohl in *E. coli*- als auch in Kaninchenleber- Lysin- tRNAs im Verlauf der Evolution erhalten worden und identisch sein.

Durch Vergleich der Sequenzen der Lysin-tRNAs aus *E. coli* und Kaninchenleber sollten sich somit diejenigen Sequenzen, die in diesen tRNAs identisch sind, als Erkennungssequenzen für die lysinspezifischen Synthetasen identifizieren lassen (Abb. 39).

In Abb. 39 sind diejenigen Nukleotide angegeben, die in den Lysin-tRNAs aus *E. coli* und Kaninchenleber identisch sind. Die auffälligsten Übereinstimmungen bestehen im Dihydrouridinarm und der Dihydrouridinschleife. Vergleicht man jedoch die Sequenzen aller anderen bisher sequenzierten tRNAs (ca. 60), so erkennt man, daß diese Sequenzen in sehr vielen tRNAs vorkommen. Sie können deshalb nicht für die Erkennung dieser tRNAs durch die lysinspezifischen Synthetasen verantwortlich sein. Das Anticodon kommt dafür ebenfalls nicht in Frage (84-87) und das Guanosin in Position 6 vom 5'-Ende der Lysin-tRNAs kommt auch bei einer ganzen Reihe von tRNAs vor.

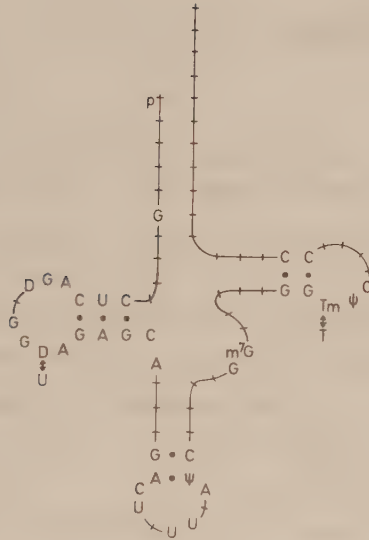


Abb.: 39: Übereinstimmende Nukleotide in tRNA^{Lys}₂ (bzw. tRNA^{Lys}₄) aus Kaninchenleber und tRNA^{Lys} aus E. coli B (83) ohne Berücksichtigung der obligatorischen 3'-terminalen Sequenz CCA.

Da auch die anderen Übereinstimmungen nicht auf Lysin-tRNAs beschränkt sind, ist daraus zu schließen, daß die lysinspezifischen Synthetasen aus E. coli und Kaninchenleber nicht bestimmte Sequenzen, sondern die Tertiärstruktur der Lysin-tRNAs erkennen. Das bedeutet, daß die weitgehenden Änderungen der Nukleotidsequenzen der Lysin-tRNAs im Verlauf der Evolution unter Erhaltung der für die Synthetaseerkennung wichtigen Tertiärstrukturbereiche erfolgten.

5. Experimenteller Teil

5.1. Material und Geräte

5.1.1. Enzyme

Schlangengiftphosphodiesterase (E.C. 3.1.4.1) wurde von der Fa. Worthington Biochemical Corporation bezogen.

Ribonuklease T₁ (E.C. 3.1.4.8) und Ribonuklease T₂ (E.C. 3.1.4.23) aus *Aspergillus oryzae* sowie Ribonuklease U₂ (E.C. 3.1.4.-) aus *Ustilago sphaerogena* stammen von der Fa. Sankyo Co. Ltd., Tokyo.

5'- Polynukleotidkinase aus T₄- infizierten *E. coli*- Zellen wurde im hiesigen Laboratorium isoliert (43,44) und von Herrn Dr. D. Wildenauer zur Verfügung gestellt.

Ribonuklease A aus Rinderpankreas (E.C. 3.1.4.22), alkalische Phosphatase aus *E. coli* (E.C. 3.1.3.1), Hexokinase aus Hefe (E.C. 2.7.1.1), Phosphoglyceratkinase (E.C. 2.7.2.3)/ Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase aus Hefe (E.C. 1.2.1.12)/ Kaninchenmuskel und Polynukleotidphosphorylase aus *Micrococcus lysodeicticus* (E.C. 2.7.7.8) wurden bei der Fa. Boehringer, Mannheim gekauft.

5.1.2. Materialien für die Säulenchromatographien

DEAE- Sephadex A-50 war ein Produkt der Fa. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala.

DEAE- Zellulosen DE23 sowie DE52 stammten von Whatman Biochemicals Ltd.

RPC-5 wurde im hiesigen Laboratorium aus Tricetylmethylammoniumchlorid und Polychlortrifluoräthylenpulver hergestellt (31,88).

Benzoylierte DEAE- Zellulose lieferte die Fa. Boehringer, Mannheim.

5.1.3. Radioaktive Verbindungen und Röntgenfilme

Alle radioaktiven Verbindungen stammen von der NEN- Chemicals GmbH, Dreieichenhein.

Autoradiographien wurden mit Kodak RP Royal X-Omat (RP/R54)-Röntgenfilm ausgeführt.

5.1.4. Nukleoside und Nukleotide

N²- Monomethyl- Guanosin und N²- Dimethyl- Guanosin waren ein Geschenk von Dr. M. Saneyoshi, Tokyo.

5- Methyl- Cytidin, 1- Methyl- und 6- Methyl- Adenosin

stammten von Cyclo Chemicals, Los Angeles.

2- Thio-5- carboxymethyluridinmethylester sowie 2- Thio-5-(N- Methylaminomethyl)-uridin wurden freundlicherweise von Herrn Dr. H. Vorbrüggen, Schering AG, Berlin zur Verfügung gestellt.

Alle anderen Nukleoside und Nukleotide lieferte die Fa. Boehringer, Mannheim.

5.1.5. Dünnschichtchromatographie

Dünnschichtfertigplatten (20 x 20 cm), Zellulose ohne Fluoreszenzindikator lieferte die Fa. Merck, Darmstadt.

Polygram Cel 300 DEAE-/HR- 2/15- Platten (20 x 40 cm) wurden bei der Fa. Macherey - Nagel und Co., Düren, gekauft.

5.1.6. Hochspannungselektrophorese

Für die erste Dimension verwendete man Zelluloseacetatstreifen (30 x 550 mm) der Fa. Schleicher und Schüll GmbH, Dassel. Die zweite Dimension wurde mit Whatman DE81- Papier (570 x 460 mm) ausgeführt.

5.1.7. Geräte

Zentrifugen: Stock- Zentrifuge Größe 8 x 1350/ -10°C.

Ultrazentrifuge IEC B- 60 und IEC B- 20.

Heraeus Christ Minifuge.

Heraeus Christ HC- 102 Mikrofuge.

Massenspektrometer: CH7 der Fa. Varian Mat: Einlaß bis 275°C,
Elektronenenergie 70 eV, Emission 300
μAmp.

UV- Spektrophotometer: Gilford, Modell 240, selbstregistrierend.

Scintillationsspektrometer: Packard Tricarb, Modell 3380
mit AAA oder Modell 3390.

Hochspannungselektrophorese: Savant Inst. Inc., Hicksville,
New York, Modell 8036.

5.2. Methoden

5.2.1. Verwendung von Ionenaustauschern

5.2.1.1. Herstellung von RPC-5

In 2,5 l Chloroform wurden 25 gr Adogen 464 (Tricetylmethylammoniumchlorid) eingerührt. Zu dieser Lösung gab man 100 gr Polychlortrifluoräthylenpulver (Serva). Unter Rühren und Einblasen von vorgetrockneter Luft wurde der Suspension bei Zimmertemperatur das Chloroform entzogen; danach wurde im Wasserstrahlvakuum getrocknet (31,88).

5.2.1.2. Vorbereitung von Ionenaustauschern

RPC-5 wurde in 1,3 M NaCl/ 0,01 M Natriumacetat pH 4,5 aufgenommen und abgesaugt. Es erfolgte mehrmaliges Aufnehmen in Startpuffer.

35 gr DEAE- Sephadex A-50 wurden in 1 M NaCl/ 0,02 M Tris-HCl pH 7,5 aufgenommen. Nach fünfstündigem Stehen wurde dekantiert und abgesaugt. Anschließend suspendierte man in 1 l Wasser und ließ über Nacht im Kühlschrank stehen. Nach Dekantieren, Absaugen sowie dreimaligem Äquilibrieren in Startpuffer war das Material gebrauchsfertig.

Benzoylierte DEAE- Zellulose (BD- Zellulose) wurde in 2 M NaCl + 10% Äthanol eingerührt. Nach fünfstündigem Stehen verwarf man die obenschwimmende Schicht; äquilibrieren erfolgte mit dem gewünschten Startpuffer.

DEAE- Zellulose DE23 ließ man 30 Minuten in 0,5 N NaOH stehen. Nach mehrfachem Waschen mit Wasser wurde in 0,5 N HCl aufgenommen (30 Minuten). Anschließend erfolgte wieder Waschen mit Wasser und danach Aufnehmen in Startpuffer.

DEAE- Zellulose DE52 wurde nach Herstellerangaben vorbehandelt.

Alle Zellosolesuspensionen wurden ständig im Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt.

5.2.2. Präparation von Aminoacyl- tRNA- Synthetase aus Kaninchenleber

Sämtliche Einzelschritte fanden bei 0°C statt.

Eine Kaninchenleber (76 gr) wurde mit 60 ml "Synthetase-puffer" (0,01 M Tris-HCl pH7,5, 0,01 M MgCl₂, 10% Glycerin, 0,01 M Merkaptoäthanol) im Mixer (Braun) homogenisiert.

Nach zwei Zentrifugationsschritten (27500 g und 136000 g, das Pellet wurde jeweils verworfen) wurde der resultierende Überstand durch Zugabe von festem Kochsalz auf eine Molarität von 0,3 M NaCl gebracht und die Lösung über eine 10 x 3 cm DEAE- Zellulose- (DE52) Säule filtriert, die mit 0,3 M NaCl, 0,01 M Tris-HCl pH 7,5, 0,01 M MgCl₂, 10% Glycerin und 0,01 M Merkaptoäthanol äquilibriert war. Das Säuleneluat betrug 60 ml und wurde über Nacht gegen "Synthetasepuffer" in 50%igem Glycerin dialysiert. Das Dialysat wurde in kleinen Portionen bei -20°C verwahrt und behielt seine Synthetaseaktivität mehr als ein Jahr lang.

5.2.3. Aminoacylierung von Kaninchenleber- tRNA

Zur Auffindung von spezifischer tRNA während des Reinigungsprozesses im Elutionsmuster der entsprechenden Säulen sowie zum Test auf Reinheit sind Aminoacylierungsreaktionen erforderlich. Diese wurden durchgeführt wie beschrieben bei Hoskinson und Khorana (30).

5.2.4. Isolierung von Kaninchenleber- tRNA (29)

5.2.4.1. Phenolextraktion

Je 100 gr tiefgefrorene Kaninchenleber wurden mit 150 ml wäßriger Phenollösung (1 kg Phenol + 120 ml $H_2O \triangleq 12\%$, 1,1 gr 8-Hydroxychinolin $\triangleq 0,1\%$), 45 ml 1 M Saccharoselösung und 150 ml 0,1 M Tris-HCl pH 7,5 mit 0,1% Bentonit versetzt . Es wurde zwei Minuten im Mixer (Braun) homogenisiert. Nach einstündigem Schütteln zentrifugierte man bei 5000 g von der Phenolphase ab. Die wäßrige Phase enthielt die löslichen Nukleinsäuren, während in der Phenolphase das denaturierte Eiweiß blieb.

5.2.4.2. Erste Äthanol-fällung

Die vereinigten wäßrigen Phase wurden mit 0,1 Volumenteilen 20%igem Natriumacetat pH 5,1 versetzt; die Fällung erfolgte mit dem zweifachen Volumen Äthanol. Nach kräftigem Schütteln und Stehenlassen über Nacht im Kühlraum wurde abzentrifugiert und der Rückstand dreimal gewaschen:

- (a) Äthanol/ 20%iges Natriumacetat pH 5,1 (95 : 5 Teile).
- (b) Äthanol/ 20%iges Natriumacetat pH 5,1/ Äther (0,9:0,1:1).
- (c) Äther.

Nach dem letzten Waschschrift wurde der Rückstand gesammelt und im Vakuumexsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

5.2.4.3. Adsorption an DEAE- Zellulose

Der getrocknete Niederschlag wurde in 4,5 l 0,1 M Natriumacetat pH 5,1 eingebracht, im Verlaufe von zwei Stunden gelöst und mit 1300 gr DEAE- Zellulose Serva S + S (äquilibriert mit 0,1 M Natriumacetat pH 5,1) verrührt. Im "Batch"- Verfahren wurde solange mit 0,1 M Natriumacetat pH 5,1 gewaschen, bis das Filtrat mit dem zweifachen Volumen Äthanol keine Trübung mehr gab. Anschließend wusch man mit 0,1 M NaCl, 0,2 M NaCl und 0,3 M NaCl in 0,1 M Natriumacetat pH 5,1. Die Filtrate wurden verworfen.

Zur Desorption der tRNA- haltigen Nukleinsäurefraktion wurde die Zellulose solange mit kleinen Mengen 1 M NaCl/ 0,1 M Natriumacetat pH 5,1 digeriert, bis das Filtrat bei 260 nm eine optische Dichte von weniger als 0,1 Einheiten pro ml hatte.

5.2.4.4. Zweite Äthanolfällung

Die Filtrate wurden vereinigt und mit dem zweifachen Volumen Äthanol versetzt. Nach zwölfstündigem Stehen bei +4°C wurde abzentrifugiert, der Rückstand zweimal mit Äthanol/ Äther (1 : 1) sowie einmal mit Äther gewaschen und wieder über Phosphorpentoxid getrocknet.

5.2.4.5. Isopropanolfällung

Dieser Schritt diente der Abtrennung noch vorhandener mRNA, rRNA und kurzkettiger DNA- Bruchstücke. Die Trockensubstanz wurde in 327,5 ml 0,3 M Natriumacetat pH 5,1 (50 ml Puffer/ 1 gr Trockengewicht) gelöst. In diese Lösung tropfte man langsam 177 ml Isopropanol ($\approx 0,54$ Volumenteilen). Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und verworfen. Die gesammelten Überstände versetzte man erneut mit Isopropanol (144 ml $\approx 0,44$ Volumenteile). Dieser zweite Niederschlag enthielt die tRNA. Gewaschen und getrocknet wurde wie bei der zweiten Äthanol-fällung. Die Ausbeute an tRNA schwankte bei den einzelnen Präparationen zwischen 40 mg und 60 mg pro 100 gr Kaninchenleber.

5.2.5. Isolierung reiner tRNA₃^{Lys} aus Kaninchenleber

5.2.5.1. Säulenchromatographie an DEAE- Sephadex A-50

Dieser Austauscher trennt nach Kettenlänge, Basenzusammensetzung und Ionenwechselbeziehungen, wobei die Wechselwirkungen zwischen Purinen und der Matrix eine besondere Bedeutung aufweisen (89,90).

Die Säulenabmessungen betragen 150 x 2 cm. DEAE- Sephadex A-50 wurde mit "Startpuffer" (0,31 M NaCl, 0,01 M MgCl₂, 0,02 M Tris-HCl pH 7,5) äquilibriert und damit die Säule gefüllt. Nach gründlichem Waschen wurden 2 gr unfraktionierte

Kaninchenleber- tRNA in 280 ml Startpuffer gelöst und auf die Säule aufgetragen. Eluiert wurde mit einem linearen Kochsalzgradienten von 0,31 M NaCl (2500 ml) bis 0,41 M NaCl (2500 ml) in 0,01 M MgCl_2 und 0,02 M Tris-HCl pH 7,5. Die Auslaufgeschwindigkeit betrug 5 Sekunden pro Tropfen. Gesammelt wurden Fraktionen mit einem Volumen von ca. 12 ml. Die eluierten Fraktionen wurden nach Hoskinson und Khorana (30) auf Lysinakzeptorverhalten getestet; die Fraktionen, die $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ enthielten, wurden gesammelt und mit dem zweifachen Volumen Äthanol gefällt, nach zwölfstündigem Stehen bei -20°C abzentrifugiert und im Exsikkator über Phosphor-
pentoxid getrocknet.

5.2.5.2. Chromatographie an benzoylierter Zellulose

Bei der benzoylierten DEAE- Zellulose (BD- Zellulose) sind die Hydroxylgruppen der Zellulose mit Benzoesäure verestert. Dadurch werden nichtionische Bindungen zu den Ribonukleotiden verstärkt. Es zeigt sich, daß hauptsächlich die verschiedenen modifizierten Purin- bzw. Pyrimidinbasen für eine Auftrennung verantwortlich sind.

Nach dem Packen einer 81 x 1,3 cm Säule mit BD- Zellulose, suspendiert in Startpuffer (0,45 M NaCl, 0,01 M MgCl_2), wurden die tRNA- Fraktionen aus der DEAE- Sephadex A-50- Säule in 80 ml Startpuffer gelöst und aufgetragen. Die Fraktionierung erfolgte mit einem Kochsalz/ Äthanolgradienten von

0,45 M NaCl (600 ml) bis 1 M NaCl/10% Äthanol (600 ml) in 0,01 M $MgCl_2$. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 4 Sekunden pro Tropfen und das Fraktionsvolumen 4,5 ml. Wie die Tests auf Lysinakzeptorverhalten zeigten, war nach dieser Chromatographie die $tRNA_3^{Lys}$ schon sehr rein (85 - 90%). Die entsprechenden Fraktionen wurden wieder wie unter 5.2.5.1. beschrieben gesammelt und gefällt.

5.2.5.3. Chromatographie an RPC-5

RPC-5 zeichnet sich durch ein hohes Auflösungsvermögen isozzeptierender tRNA- Spezies aus. Erreicht wird dies durch eine Chromatographie, die sowohl Ionenaustausch- als auch differentielle Löslichkeitseigenschaften ausnutzt (31,88,92).

Es wurde eine Hochdrucksäule mit den Abmessungen 100 x 1,2 cm benützt. Nach Äquilibrierung und Einstellung eines konstanten Drucks auf 4 kp/cm^2 wurden die $tRNA_3^{Lys}$ - Fraktionen aus der BD- Säule aufgetragen. Eluiert wurde mit einem Kochsalzgradienten von 0,45 M NaCl (300 ml) bis 0,8 M NaCl (300 ml) in 0,01 M Natriumacetat pH 4,4, 0,01 M $MgCl_2$, 0,001 M Merkaptot-äthanol und 0,01% Natriumazid. Die Auslaufgeschwindigkeit lag bei 3,5 Sekunden und das Fraktionsvolumen betrug 2,8 ml. Wie Aminoacylierungstests sowie andere Kriterien zeigten, war die $tRNA_3^{Lys}$ nach diesem Schritt äußerst rein und konnte somit zu den folgenden Sequenzierungsexperimenten herangezogen werden.

5.2.5.4. Fraktionierung von Oligonukleotiden an der "Tener"- Säule

Für diese Fraktionierung wurde DEAE- Zellulose DE23 verwendet. Ihr Trennprinzip erklärt sich in der ionischen Wechselwirkung zwischen Oligonukleotiden und dem Austauscher sowie sekundären Bindungskräften von hydrophiler und hydrophober Natur. Durch die Verwendung von 7 M Harnstoff im pH-Bereich von 5,4 und 8,0 werden die sekundären Kräfte weitgehend eliminiert; daraus resultiert eine Trennung vorwiegend nach Ladung. Ein zusätzlicher Harnstoffeffekt ist die Hemmung der Aggregationstendenz zwischen den Oligonukleotiden (32,93,94).

Die Säulenabmessungen betrugen 140 x 0,6 cm. Die Zellulose wurde in 0,05 M NaCl in 7 M Harnstoff und 0,02 M Tris-HCl pH 7,5 aufgenommen. Nach dem Füllen und Waschen der Säule wurde ein Ribonuklease T₁- Hydrolysat (s.u.) von reiner Kaninchenleber tRNA₃^{Lys} aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Kochsalzgradienten von 0,05 M NaCl (1200 ml) bis 0,45 M NaCl (1200 ml) in 7 M Harnstoff und 0,02 M Tris-HCl pH 7,5. Die Fließgeschwindigkeit lag bei 17 Sekunden pro Tropfen und das Fraktionsvolumen war jeweils 4,2 ml. Sechzehn getrennte Fraktionsbereiche steigender Kettenlänge wurden gesammelt und ihrer weiteren Charakterisierung zugeführt.

5.2.5.5. Entsalzen von Oligonukleotiden über DEAE- Zellulose
DE23

Für die klassischen Sequenzierungsmethoden bezüglich der Oligonukleotide aus der "Tener"- Säule war es nötig, den Harnstoff wieder zu entfernen. Die Oligonukleotidfraktionen wurden ihrer Kettenlänge entsprechend auf das fünf- bis zehnfache Volumen mit destilliertem Wasser verdünnt und auf die DEAE- Zellulose- Säule (Durchmesser: 0,5 cm, Packungshöhe: 4 cm), äquilibriert mit 0,01 M TEAB pH 8,0, aufgetragen. Anschließend wurde zweimal mit demselben Puffer mit je 50 ml nachgewaschen. Die Oligonukleotide binden an die Zellulose, während der Harnstoff durchläuft. Die Elution erfolgte mit 2 M TEAB pH 8,2. Die vereinigten Fraktionen wurden im Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt; das wurde anschließend noch zweimal nach Zugabe von je 2 ml Äthanol wiederholt.

5.2.6. Inkubationsansätze für Spaltungen von Oligonukleotiden mit verschiedenen Enzymen

5.2.6.1. Ribonuklease T₁ aus Aspergillus oryzae
(Ribonucleateguanine- nucleotide- 2'- transferase
cyclizing, E.C. 3.1.4.8)

Als Endonuklease spaltet die Ribonuklease T₁ bei Guanosin und den meisten Guanosin- Derivaten. Über zyklische Guanosin- 2'-,3'- phosphate bilden sich Bruchstücke mit endstän-

ständigem Guanosin- 3'- phosphat.

Inkubationsansatz: 300 A₂₆₀- Einheiten tRNA₃^{Lys} und 600 Einheiten Ribonuklease T₁ in 2,7 ml 0,025 M Tris-HCl pH 7,5.

Inkubationszeit: 5 Stunden bei 37°C.

5.2.6.2. Ribonuklease T₂ aus Aspergillus oryzae
(Ribonuclease- 3'- oligonucleotide-hydrolase,
E.C. 3.1.4.23)

Die Endonuklease T₂ spaltet Ribonukleinsäuren zu Nukleosid-3'- phosphaten.

Inkubationsansatz: 0,2 A₂₆₀- Einheiten Oligonukleotid oder tRNA₃^{Lys} und 0,5 Einheiten Ribonuklease T₂ in 50 µl 0,001 M Kaliumacetat pH 4,7.

Inkubationszeit: 5 Stunden bei 37°C.

5.2.6.3. Ribonuklease A aus Rinderpankreas und alkalische
Phosphatase aus E. coli
(Ribonuclease- pyrimidine- nucleotide- 2'- transfe-
raser, cyclizing, E.C. 3.1.4.22; orthophosphoric-mono
ester- phosphorylase, alkaline optimum, E.C. 3.1.3.1)

Ribonuklease A ist eine Endonuklease und spaltet spezifisch bei Pyrimidinnukleotiden. Als Zwischenstufe entstehen zykli-

sche 2'-,3'- Phosphate, aus denen Pyrimidin- 3'- phosphate bzw. entsprechende Oligonukleotide resultieren.

Alkalische Phosphatase spaltet nur endständige Phosphatgruppen ab. Es bilden sich Nukleoside oder Oligonukleotide mit freien Hydroxylgruppen an den Enden.

Inkubationsansatz: 2,2 A₂₆₀- Einheiten Oligonukleotid, 20 µgr Ribonuklease A und 5 µgr alkalische Phosphatase in 500 µl 0,02 M TEAB pH 8,0.

Inkubationszeit: 4,5 Stunden bei 37°C.

5.2.6.4. Schlangengiftphosphodiesterase aus Crotalus Adaman-
teus
(Orthophosphoric- diester- phospho- hydrolase,
E.C. 3.1.4.1)

Das Enzym ist eine Exonuklease und spaltet vom 3'- Ende her unter Bildung von 5'- Mononukleotiden.

Inkubationsansatz: 2 - 5 A₂₆₀- Einheiten Oligonukleotid und 25 µgr Schlangengiftphosphodiesterase in 70 µl 0,14 M TEAB pH 8,5.

Inkubationszeit: 5 Stunden bei 37°C.

5.2.6.5. Ribonuklease U_2 aus *Ustilago sphaerogena*

(Ribonucleate- purine- nucleotide- 2'-transferase,
cyclizing, E.C. 3.1.4.-)

Ribonuklease U_2 ist relativ wenig basenspezifisch. Unter geeigneten Bedingungen spaltet die Endonuklease jedoch nur nach Purinen. Im Falle von T_1 - Oligonukleotiden entstehen über zyklische 2'-,3'- Phosphatzwischenstufen Bruchstücke, die am 3' terminalen Ende eine Adenosin- 3'- phosphatgruppierung tragen. Allgemein gilt für die Spezifität von Ribonuklease U_2 : $U < C \ll G < A$ (95-97).

Inkubationsansatz: 1,35 A_{260} - Einheiten T_1 - Oligonukleotid
und 0,03 Einheiten Ribonuklease U_2 in
7 μ l 0,05 M Natriumacetat pH 4,4.

Inkubationszeit: 16 Stunden bei 37°C.

5.2.6.6. Polynukleotidphosphorylase aus *Micrococcus lyso-*
deicticus

(Polynucleotide: orthophosphate- nucleotidyltrans-
ferase, E.C. 2.7.7.8)

Die 3'- Exonuklease Polynukleotidphosphorylase baut in Anwesenheit von anorganischem Phosphat Oligonukleotide mit freiem 3'- Hydroxylende ab. Es resultieren das 5'- Ende als Dinukleosidmonophosphat oder Trinukleosiddiphosphat sowie die abgespaltenen Nukleotide als 5'- Nukleosiddiphosphate (98).

Inkubationsansatz: 0,98 A₂₆₀- Einheiten Oligonukleotid und
27 µgr Polynukleotidphosphorylase in
0,01 M MgCl₂ und 0,05 M Kaliumphosphat
pH 7,5.

Inkubationszeit: 6 Stunden bei 37°C.

5.2.7. Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie dient bei der "klassischen" Sequenzierung der Reinigung von Fragmenten sowie der Charakterisierung von Nukleosiden und Nukleotiden. Ein zu identifizierendes Nukleosid oder Nukleotid mußte in drei verschiedenen Laufmitteln einen identischen R_f- Wert mit authentischem Material zeigen. Waren noch Zweifel vorhanden, führte die "Mischtechnik" zum Ziel. In diesem Falle wurden auf eine Dünnschichtplatte eng nebeneinander aufgetragen:

- (a) authentisches Material
- (b) Mischung aus authentischem Material und fraglichem Nukleosid/ Nukleotid
- (c) fragliches Nukleosid/ Nukleotid

Für ein positives Ergebnis wurden identische R_f- Werte für alle drei Flecken verlangt; besonders wichtig war eine vollkommene Homogenität der Mischung (b).

Ließen die Ergebnisse aus der Dünnschichtchromatographie

keine Zweifel mehr zu und korrespondierten sie gut mit den entsprechenden Daten aus den Ultraviolett- Spektren, so galt das entsprechende Nukleosid/Nukleotid als identifiziert.

Für unterschiedliche Probleme standen mehrere Laufmittel zur Auswahl:

5.2.7.1. Zur Identifizierung von Nukleosiden

Laufmittel A: Isopropanol / konz. Ammoniak / Wasser

7 : 1 : 2

5.2.7.2. Zur Identifizierung von 3'- und 5'- Nukleotiden

Laufmittel B: n- Propanol / konz. Ammoniak / Wasser

55 : 10 : 35

Laufmittel C: Isobuttersäure / konz. Ammoniak / Wasser pH 3,7

66 : 1 : 3

5.2.7.3. Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie

5.2.7.3.1. Mononukleotide aus Spaltung mit Ribonuklease T₂

Die Methode für die zweidimensionale Auftrennung von Nukleotiden stammt von Dr. M. Saneyoshi, Tokyo (99):

Laufmittel D: Isobuttersäure / konz. Ammoniak / Wasser pH 4,3

577 : 38 : 385

Laufmittel E: t- Butanol / Salzsäure / Wasser

7 : 1,5 : 1,5

Die erste Dimension wurde in Laufmittel D, die zweite in Laufmittel E entwickelt.

5.2.7.3.2. Trennung von Oligonukleotiden

Laufmittel F: t- Butanol / 0,5 M Ameisensäure pH 3,8

1 : 1

Die erste Dimension wurde in Laufmittel C, die zweite in Laufmittel F entwickelt.

5.2.8. Behandlung von Oligonukleotiden mit N- cyclo- hexyl- β- [4- methylmorpholinium] - äthylcarbodiimid-p- toluolsulfonat (CMCT)

Um bei Sequenzierungsproblemen die Spezifität von Ribonuklease A gegenüber Pyrimidinen zu erhöhen, schlug Gilham (35,36) vor, Uridin zu blockieren. Nach CMCT- Behandlung von RNA kann die pankreatische Ribonuklease nur noch bei Cytidinen spalten.

Inkubationsansatz: 2 A₂₆₀- Einheiten Oligonukleotid und
0,055 M CMCT in 72 µl 0,055 M Tris-HCl
pH 8,0.

Inkubationszeit: 6 Stunden bei 37°C.

Reinigung des Umsetzungsproduktes erfolgte durch Dünnschichtchromatographie in Laufmittel C. Das gereinigte Material wurde ausgekratzt und mit 0,001 M TEAB pH 8,5 eluiert. Daran anschließend führte man eine kombinierte Spaltung mit Ribonuklease A und alkalischer Phosphatase aus; die Reaktionsprodukte wurden wieder mittels Dünnschichtchromatographie in Laufmittel C getrennt. Nach Isolierung der Fragmente wurde das CMCT durch eine vierstündige Inkubation bei 37°C in jeweils 100 µl 0,2 M Triäthylamin abgespalten. Eine abschließende Spaltung mit Ribonuklease T₂ ergab wertvolle Aufschlüsse über die Sequenz des untersuchten Oligonukleotids.

5.2.9. Der Whitfeld- Abbau

Whitfeld (48,49) beschrieb eine Methode zum schrittweisen Abbau von Polyribonukleotiden durch Perjodat- Oxydation der vicinalen Hydroxylgruppen der Ribose am 3'- Ende. Anschließend Behandlung mit Glycin bei pH 10,5 entfernt die terminale Base. Khym und Cohn (100,101) zeigten eine Aminaddition als Reaktionsprodukt und den nachfolgenden Zerfall über eine β- Eliminierung. Neu und Heppel (102) beschäftigten sich mit der Optimierung der Reaktionsbedingungen.

Reaktionsansatz: 0,4 A₂₆₀- Einheiten Oligonukleotid und 20 µl
200 mM Natriumtetroxodat (VII), pH 8,0.

Inkubationszeit: 20 Minuten bei 24°C im Dunkeln

Die pH- Einstellung der Reaktionslösung gelang mit 1 M Kaliumphosphat pH 8,0. Die Aminierung mit der entsprechenden Folgereaktion wurde durch die Zugabe von 1 μ l destilliertem Cyclohexylamin und anschließende Inkubation erreicht (90 Minuten bei 45°C). Nach Abschrecken wurde 1 μ l einer 1 μ M Äthylenglycollösung zugegeben und nochmals 15 Minuten bei 24°C inkubiert; dies diente der Zerstörung von überschüssigem Natriumtetroxojodat. Die Isolierung der entstandenen Reaktionsprodukte erfolgte durch Dünnschichtchromatographie in Laufmittel B.

5.2.10. UV- Spektroskopie

Die einzelnen Proben wurden mit dem Spektrophotometer im Bereich von 220 - 330 nm bei pH 1,0, pH 7,0 und pH 13 gemessen. Die erhaltenen Spektren verglich man mit Literaturwerten (103,104).

Zur Identifizierung von Dihydrouridin bediente man sich der Alkalilabilität dieser Verbindungsklasse (33,34). Bei dieser Zersetzungsreaktion wird unter Aufbrechen des Pyrimidinringes ein β - Ureidopropionsäurederivat gebildet.

Durch Zugabe von 5 μ l 10 N NaOH zu 1 ml 5,6- Dihydrouridinlösung tritt spontan eine zwei- bis dreifache Adsorptionserhöhung bei 230 nm ein; anschließend wird bei derselben Wellenlänge ein charakteristischer, linearer und langsamer Adsorptionsabfall beobachtet.

5.2.11. "Klassische" Sequenzierung: Charakterisierung von Oligonukleotiden

Zur Charakterisierung der einzelnen T_1 - Fragmente wurden in jedem Falle eine Spaltung mit Ribonuklease T_2 und anschließende zweidimensionale Dünnschichtchromatographie in den Laufmitteln D (1. Dimension) und E (2. Dimension) ausgeführt. Diese Versuche ergaben erste Aufschlüsse über die Nukleotidzusammensetzung.

Bevor andere Methoden angewendet wurden, erfolgte zunächst eine präparative Behandlung der Oligonukleotide mit alkalischer Phosphatase mit anschließender eindimensionaler Dünnschichtchromatographie in Laufmittel B, weil Oligonukleotide nach Entfernung des endständigen 3'- Phosphats in der Dünnschichtchromatographie eine höhere Mobilität haben als die entsprechenden 3'- Phosphate. Neben dem Reinigungseffekt (Trennung verschiedener Oligonukleotide) diente dieser Vorgang zur Vorbereitung einer Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase. Diese Spaltung diente der Identifizierung des am 5'- Ende stehenden Nukleosids in den Laufmitteln A, B oder C.

Unter UV- Licht bei 254 nm wurden die entsprechenden Banden oder Flecken eingezeichnet, ausgekratzt und mit 3 x 500 μ l 0,01 M TEAB pH 8,5 eluiert. Es wurden UV- Spektren bei pH 1, pH 7 und pH 13 angefertigt sowie eine Quantitierung vor-

genommen. Bei dieser quantitativen Analyse wurden in Anwendung des Lambert - Beer'schen Gesetzes die Quotienten aus den gemessenen Extinktionen bei 260 nm und den für jedes Nukleosid/Nukleotid charakteristischen molaren Extinktionskoeffizienten berechnet (105,106). Daraus ergaben sich direkt die molaren Anteile der beteiligten Nukleotide des Gesamtfragments.

Ein weiterer Schritt zur Aufklärung eines T_1 - Oligonukleotids bestand in einer kombinierten Spaltung mit Ribonuklease A und alkalischer Phosphatase. Dabei entstanden kleinere Bruchstücke, die alle, bis auf eines, am 3'- terminalen Ende ein Pyrimidin trugen. Diese Informationen sowie Aussagen, die aus Spaltungen mit Ribonuklease T_2 oder mit Schlangengiftphosphodiesterase resultierten, gaben wertvolle Aufschlüsse hinsichtlich der Nukleotidsequenz.

5.2.12. Darstellung von γ -[^{32}P] - ATP

Die Methode, von Glynn und Chappel (42) entwickelt, bedient sich der enzymatisch gesteuerten Austauschreaktion zwischen $H_3^{32}PO_4$ und der terminalen γ - Phosphatgruppe von Adenosin-triphosphat. Die Vorschrift wurde insofern variiert, als die Isolierung von γ -[^{32}P] - ATP über eine DEAE- Zellulose- Säule (Durchmesser: 0,6 cm, Packungshöhe: 12 cm) erfolgte. Eluiert wurde mit einem linearen TEAB- Gradienten (Abbildung 40). Bei einem Einsatz von 10 mCi $H_3^{32}PO_4$ (trägerfrei) wurde eine

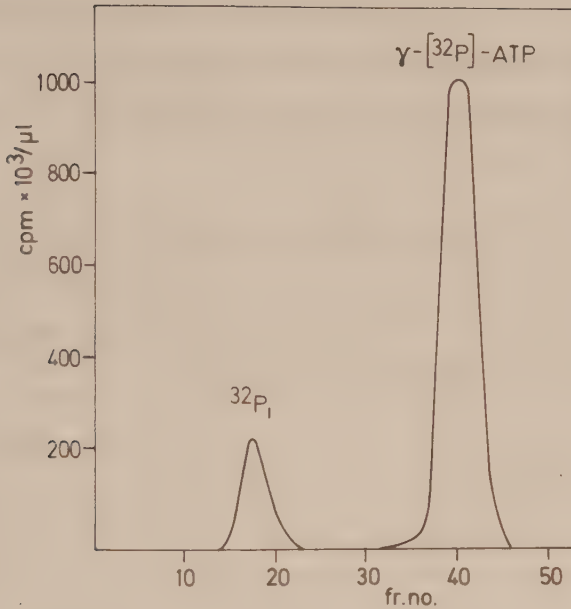


Abb. 40: Elutionsprofil von γ -[³²P]-ATP über eine DEAE-Zellulose- Säule mit einem linearen TEAB- Gradienten von 0,01 M TEAB pH 8,0 (75 ml) bis 1 M TEAB pH 8,0 (75 ml). Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte mittels Messung der Čerenkov- Strahlung im ³H- Kanal des Scintillationszählers von jeweils 1 μl aus jeder Fraktion.

spezifische Aktivität des γ -[³²P]-ATP von ca. 40 Ci/mM erreicht.

5.2.13. Spaltung von Kaninchenleber- $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ mit Ribonuklease T_1 (bzw. mit Ribonuklease A) und alkalischer Phosphatase; $[^{32}\text{P}]$ - Markierung mittels $\gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ und anschließende zweidimensionale Hochspannungselektrophorese

Es wurde nach folgendem Schema verfahren:

	RNAase A	RNAase T_1
tRNA in A_{260} - Einheiten	0,5	0,5
H_2O	80 μl	80 μl
1 M Tris-HCl pH 8,0	5 μl	5 μl
RNAase T_1 (2,4 Einheiten/ μl)	—	1 μl
RNAase A (0,5 mg/ml)	2 μl	—

Inkubation: 3 Stunden bei 37°C .

Eine zweistündige Behandlung der entstandenen Fragmente mit jeweils 0,01 Einheiten alkalischer Phosphatase (1 μl) bewirkte die Abspaltung der 3'- terminalen Phosphatgruppen. Zur Inaktivierung des Enzyms wurden 15 μl 40 mM Nitrilotriessigsäurelösung zugegeben und 20 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert; anschließend wurde für zwei Minuten auf 100°C erhitzt und danach in Eis abgeschreckt. Damit waren die Vorbereitungen für die $[^{32}\text{P}]$ - Markierung getroffen.

Im nächsten Schritt, der Kinasereaktion, wurde das 5'- Ende der Oligonukleotide mittels γ -[^{32}P]- ATP markiert. Dabei katalysiert die T_4 - Phagen- induzierte Polynukleotidkinase aus E. coli die Übertragung der γ - ^{32}P Phosphatgruppe von ATP an das 5'- Hydroxylende von Oligonukleotiden (43-47):

Oligonukleotide ($0,025 \text{ A}_{260}$ - Einheiten)	5 μl
γ -[^{32}P]- ATP (55000 cpm/ μMol , 300 $\mu\text{Mol}/\mu\text{l}$)	10 μl
0,2 M MgCl_2	1 μl
0,3 M Merkaptoäthanol	1 μl
T_4 - Kinase (1 Einheit/ μl)	4 μl

Inkubation: 30 Minuten bei 37°C .

Um für die nachfolgende Hochspannungselektrophorese das überschüssige γ -[^{32}P]- ATP aus dem interessanten Bereich des "fingerprints" zu entfernen, wurde mittels Hexokinase und Glukose Glukose-6-[^{32}P]- Phosphat gebildet.

Zu obiger Reaktionsmischung kamen 4 μl 10 mM Glukose und 1 μl Hexokinase (0,2 μg). Die Inkubationszeit betrug 5 Minuten bei 37°C .

Zwei Isotopenverdünnungsschritte unter Zugabe von jeweils 1 μl 5 mM ATP mit zehnminütiger Inkubation bei 37°C mit

folgendem Erhitzen auf 100°C und Abschrecken in Eis schlossen die Reaktionsfolge ab.

Aus der Lösung wurden 2-3 µl entnommen und auf Zellulose-acetatstreifen aufgetragen. Die erste Dimension der Hochspannungselektrophorese wurde in Pyridin/Acetat pH 3,5 (2mM EDTA, 0,5% Pyridin, 5% Eisessig) ausgeführt. Die Laufzeit betrug 1,5 Stunden bei 5000 V. Nach Übertragung auf Whatman DE81- Papier wurde die zweite Dimension in 7% iger Ameisensäure bei 500 V in ca. 16 Stunden aufgetrennt.

5.2.14. Autoradiographie

Zur Detektion deraufgetrennten Fragmente wurden die zweidimensional entwickelten Hochspannungselektrophoreseblätter mit Kodak RP Royal X-Omat (RP/R54)- Film zwei bis vierundzwanzig Stunden exponiert.

5.2.15. Partialspaltungen der [³²P]- markierten Oligonukleotide mit Schlangengiftphosphodiesterase

5.2.15.1. Messung der Radioaktivität und Elution

Die in der zweidimensionalen Hochspannungselektrophorese durch Autoradiographie lokalisierten Fragmente wurden nummeriert und ausgeschnitten. Zunächst wurde im Scintillationszähler die Radioaktivität durch Messung der Čerenkov- Strahlung bestimmt. Danach wurden die Oligonukleotide mit 2 M

TEAB pH 10,0 eluiert (107). Entfernung des Puffers erfolgte im Vakuumexsikkator; anschließend wurde noch zweimal mit je 30 µl Wasser versetzt und wieder zur Trockene gebracht.

5.2.15.2. Endgruppenbestimmungen

Von allen 5'-[³²P]- Oligonukleotiden wurde routinemäßig das 5'-[³²P]-Nukleotid durch Spaltung des entsprechenden Oligonukleotids mit Schlangengiftphosphodiesterase und nachfolgende Dünnschichtchromatographie identifiziert.

Inkubationsansatz: 5000 bis 8000 "cpm" Oligonukleotid in
0,1 bis 0,5 A₂₆₀- Einheiten tRNA- Träger
und 1-5 µg Schlangengiftphosphodiesterase
in 15 µl 0,05 M Tris-HCl pH 8,6 und
0,005 M Kaliumphosphat pH 8,6.

Inkubationszeit: 3 Stunden bei 37°C.

Die Reaktionsmischung wurde lyophilisiert und in 5 µl einer Lösung aufgenommen, die pG, pC, pU und pA enthielt. Danach wurde eine Dünnschichtchromatographie in den Laufmitteln D und E ausgeführt. Autoradiographie und Anzeichnen der sichtbaren authentischen 5'- Nukleotide im UV- Licht bei 254 nm erlaubte die Identifizierung des 5'- terminalen Nukleotids. Eine Endgruppe galt als identifiziert, wenn in beiden Laufmitteln mit authentischem Material Übereinstimmung erzielt werden konnte.

5.2.15.3. Schlangengiftphosphodiesterasespaltung der [^{32}P] -
markierten Oligonukleotide

Die radioaktiven Oligonukleotide wurden wieder in 30 μl Wasser aufgenommen und zur Kontrolle nochmals die Radioaktivität bestimmt. Danach wurden sie einem kontrollierten Abbau mit Schlangengiftphosphodiesterase unterworfen:

Reaktionsansatz: 50000 "cpm" Oligonukleotid und 0,625 μg Schlangengiftphosphodiesterase in 30 μl 21,6 mM Tris-HCl pH 8,5 und 4 mM Kaliumphosphat pH 8,5.

Vor Enzymzugabe wurden 5 μl Lösung als Nullwert entnommen und auf Whatman DE81- Papier aufgetragen. Die Inkubation fand bei Zimmertemperatur statt. Nach 2', 10', 30', 60' und 65' (nach 60' nochmals 0,625 μg Enzymzugabe und fünfminütige Inkubation bei 37°C) wurden jeweils 5 μl - Aliquote entnommen und der zeitlichen Reihenfolge entsprechend auf das Whatman DE81- Papier aufgetragen. Als Puffer für die diesbezügliche eindimensionale Hochspannungselektrophorese dienten wahlweise 7% ige Ameisensäure oder Pyridin/Acetat pH 3,5. Die Laufzeit betrug fünfzehn Stunden bei 500 V.

Nach dem Exponieren ergab sich die Sequenz durch Ermittlung der entsprechenden M- Werte (M = migration value). Dabei ist M definiert als $\frac{x}{y}$, wobei y die Distanz irgendeines Oligo-

nukleotids von der Startlinie, und x der Abstand zwischen diesem Oligonukleotid und seinem ersten Abbauprodukt ist (50). Für die Berechnung von M- Werten nach G.G. Brownlee (109) gelten die in Tabelle 11 aufgeführten empirischen Maßzahlen:

Nukleotid	M- Wert bei pH 3,5	M- Wert bei pH 1,7
pC	0,6 - 1,2	0,05 - 0,3
pA	2,1 - 2,9	0,4 - 1,1
pU	1,7 - 1,9	1,5 - 2,5
pG	2,6 - 4,4	1,2 - 3,1

Tabelle 11: Verzeichnis der empirischen Maßzahlen nach G. G. Brownlee (109) zur Berechnung von M- Werten

Diese Methode erlaubt jedoch nur eindeutige Aussagen für Fragmente deren Kettenlänge 7-8 Nukleotide nicht überschritt.

5.2.16. Homochromatographie

Steigt die Kettenlänge der [^{32}P]-markierten Oligonukleotide auf acht und höher, so wird die Auflösungsfähigkeit des DEAE- Papiers in den beiden verwendeten Puffersystemen immer schlechter und kommt schließlich in bestimmten Bereichen völlig zum Erliegen. Die Nukleotidsequenz am 3'- Ende kann dann nicht mehr identifiziert werden. Einen Ausweg aus diesem Dilemma brachte die Entwicklung der Homochromatographie

(51,52). Hierbei handelt es sich um eine zweidimensionale "fingerprint"- Technik, die in der ersten Dimension eine Ionophorese auf Zelluloseacetatstreifen in Pyridin/Acetat pH 3,5 und für die zweite Dimension eine Verdrängungschromatographie auf Dünnschichtplatten (DEAE- Zellulose) in einem geeigneten Laufmittel benutzt. Diese Separierungsmethode benötigt eine Mischung von Oligonukleotiden verschiedener Kettenlänge in 7 M Harnstoff, die durch eine kontrollierte alkalische Hydrolyse aus Ribonukleinsäure entstanden ist. Die Nukleotide sättigen die DEAE- Gruppen und verdrängen einander. Kleinere Oligonukleotide mit geringerer Affinität werden von längeren mit höherer Affinität verdrängt, laufen also rascher. Die radioaktiven Nukleotide werden auf diese Weise bezüglich ihrer unterschiedlichen Affinitäten zur DEAE- Zellulose fraktioniert.

5.2.16.1. Herstellung von Homochromatographielösungen

30 gr Ribonukleinsäure aus Hefe wurden in 300 ml Wasser gelöst. Nach Zugabe von 420 gr Harnstoff und weiteren 100 ml Wasser wurde die Mischung bei 37°C unter Rühren gelöst. Neutralisation erfolgte mit 1 M KOH. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 ml 10 N KOH und Auffüllen auf ein Volumen von 900 ml in Gang gesetzt. Zwanzigstündige Inkubation bei 65°C lieferte die gewünschte Homochromatographiemischung. Stabilisiert wurde die Lösung durch eine Einstellung des pH auf

4,7 mit Eisessig. Dieses Laufmittel (50 mM KOH) erwies sich als günstig für die Trennung von Oligonukleotiden einer Kettenlänge von 8 bis 12. Eine mit 75 mM KOH hydrolisierte Lösung bewährte sich für Tetra- bis Oktanukleotide und ein mit 30 mM KOH hydrolisiertes Laufmittel wurde für Oligonukleotide von der Länge 12 bis 16 eingesetzt (108).

5.2.16.2. Schlangengiftphosphodiesterasespaltung und zwei-dimensionale Hochspannungselektrophorese/Homochromatographie

Die Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase lehnte sich sehr eng an die Methodik an, die unter 5.2.15.3. beschrieben wurde. Im Rahmen einer Kinetik fing man die schrittweisen Abbauprodukte ab und identifizierte sie hinsichtlich ihrer Mobilität.

Inkubationsansatz: 50000 - 100000 "cpm" Oligonukleotid in 1 A₂₆₀- Einheit tRNA als Träger und 10 µgr Schlangengiftphosphodiesterase in 50 µl 0,05 M Tris-HCl pH 8,6 und 0,005 M Kaliumphosphat pH 8,6.

Inkubationszeit: 160 Minuten bei Zimmertemperatur bzw. 37°C.

Bei 0' (vor Enzymzugabe), 1', 2', 5', 10', 20', 40', 80' und 160' wurden jeweils 5 µl entnommen; davon kamen 0,5 µl auf

eine Dünnschichtplatte (DEAE- Zellulose). Der Rest wurde für eine Minute auf 100°C erhitzt und danach sofort in Trockeneis eingefroren. Die Dünnschichtplatte wurde durch Homochromatographie in einem geeigneten Laufmittel entwickelt und anschließend autoradiographiert. Das Ergebnis erbrachte den schrittweisen Abbau des betreffenden Oligonukleotids, wobei die Abspaltung eines Purins gegenüber einem Pyrimidin einen weitaus höheren Zuwachs an Mobilität zeigte. Mehrere ausgewählte 1 - 2 μl Aliquote der obigen Kinetik wurden vereinigt; nach Lyophilisieren und Aufnehmen in 3 μl Wasser wurde auf Zelluloseacetatstreifen aufgetragen. Die Trennung in der ersten Dimension erfolgte im System Pyridin/Acetat pH 3,5. Es wurde auf DEAE- Zellulosedünnschichtplatten übertragen und als zweite Dimension Homochromatographie im gewünschten Fließmittel durchgeführt. Die Abbauprodukte wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Im entstandenen Muster waren die Abspaltungen für jedes Nukleotid charakteristisch und eindeutig zuzuordnen (detaillierte Erklärungen bei den Abbildungen 19, 32 und 33 sowie Ref. 110).

5.2.17. Radioaktive Arbeitstechniken: Methodik

Spaltung mit Ribonuklease T_1 oder Ribonuklease A und Behandlung mit alkalischer Phosphatase sowie $[^{32}\text{P}]$ - Phosphorylierung der Oligonukleotide mittels γ - $[^{32}\text{P}]$ - ATP und T_4 - Kinase mit anschließender zweidimensionaler Hochspannungselektrophorese

ist der erste Schritt. Die erhaltenen, am 5'- Ende mit [^{32}P]-markierten Fragmente werden weiter untersucht. Das 5'- terminale Nukleotid wird durch vollständige Spaltung des Oligonukleotids mit Schlangengiftphosphodiesterase und Dünnschichtchromatographie identifiziert. Partieller Schlangengiftphosphodiesteraseabbau gibt durch Ermittlung der M- Werte Aufschluß über die Sequenz. In Zweifelsfällen, besonders bei sehr langen Oligonukleotiden ist die Anwendung der zweidimensionalen Hochspannungselektrophorese/Homochromatographie von hervorragender Bedeutung.

6. Zusammenfassung

1. Die Nukleotidsequenz von $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ aus Kaninchenleber wurde unter Anwendung klassischer und radioaktiver Arbeitstechniken ermittelt; sie setzt sich aus 76 Nukleotiden zusammen und läßt sich zum bekannten Kleeblatt anordnen.
2. Neben den vier normalen Nukleosiden (Uridin, Cytidin, Adenosin, Guanosen) enthält die $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ 14 seltene Nukleoside: N^2 -Monomethylguanosen (m^2G), dreimal Pseudouridin (Ψ), dreimal Dihydrouridin (D), 2-Thio-5-carboxymethyluridinmethylester ($\text{mcm}^5\text{s}^2\text{U}$), das hochmodifizierte Purinderivat X (28), N^7 -Methylguanosen (m^7G), zweimal 5-Methylcytidin (m^5C), 2'-O-Methylribos-thymidin (Tm) und 1-Methyladenosin (m^1A).
3. In $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ wird die Ribosomenbindungssequenz von $\text{GTm}\psi\text{C}$ gebildet. Mit der Strukturaufklärung von Tm als 2'-O-Methylribos-thymidin wurde dieses hochmodifizierte Nukleosid zum erstenmal als Bestandteil einer Nukleinsäure nachgewiesen.
4. Proteinbiosyntheseexperimente im in vitro-System mit Poly A und Poly (AAG) zeigten eindeutig, daß 2'-O-Methylribos-thymidin keinen Einfluß auf die Proteinbiosyntheseaktivität von $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ aus Kaninchenleber ausübt; das Codon AAA wird gegenüber AAG bei einem Anti-

codon von SUU (S = 2'-Thio-5-carboxymethyluridinmethyl-ester) in $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ bevorzugt.

Weitere im hiesigen Laboratorium sequenzierte Lysin-tRNAs besitzen das Anticodon CUU und werden nur vom Codon AAG erkannt.

5. Durch radioaktive Sequenzierungstechniken konnte gezeigt werden, daß die aus verschiedenen säulenchromatographischen Stufen isolierten und getrennt gereinigten $\text{tRNA}_{3A}^{\text{Lys}}$ und $\text{tRNA}_{3B}^{\text{Lys}}$ sequenzgleich sind und keinen Beitrag zur Multiplizität isoakzeptierender Lysin-tRNAs liefern. Sie unterscheiden sich von $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ nur durch den Verlust des 3'-terminalen Adenosins, der in vivo oder während des Reinigungsprozesses aufgetreten sein muß.
6. Nach Ortwerth et al. (24,25) ist eine lysinspezifische tRNA mit der Zellteilung assoziiert ($\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$). Die in dieser Arbeit beschriebene Sequenzanalyse dieser Lysin-tRNA aus SVT2-Zellen zeigte, daß es sich nicht um das Transkriptionsprodukt eines eigenen Gens handelt, sondern daß sich diese tRNA von einer der normalen Lysin-tRNAs mit dem Anticodon CUU ableitet ($\text{tRNA}_{2B}^{\text{Lys}}$), die ebenfalls im hiesigen Laboratorium sequenziert wurde.
7. Die mit der Zellteilung assoziierte $\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$ zeichnet sich gegenüber $\text{tRNA}_{2B}^{\text{Lys}}$ durch mehrere Modifikationen aus: sie enthält z.T. U anstelle von D (5,6-Dihydrouridin) oder Ψ

Pseudouridin); das modifizierte Adenosin neben dem Anticodon ist nicht wie in der normalen tRNA mit t^6A (N- [9-(β -D-Ribofuranosyl)-purin-6-yl-carbamoyl] -L-threonin) identisch, sondern diesem nur sehr ähnlich. Die Untermodifikationen entstehen offensichtlich dadurch, daß die tRNA-modifizierenden Enzyme bei hoher Zellteilungsrate nicht mit der gesteigerten tRNA-Synthese Schritt halten können.

8. Die Identifizierung von U, T, Tm und Ψ in Position 23 vom 3'-Ende als Bestandteil der Ribosomenbindungssequenz läßt den Biosyntheseweg von Tm erkennen. Demnach wird aus Uridin zunächst Ribothymidin und in einem zweiten Schritt durch Methylierung der 2'-Hydroxylgruppe der Ribose das 2'-O-Methylribothymidin gebildet.
9. Hochinteressant ist die Beteiligung des Oligonukleotids G $\Psi\Psi$ C am Sequenzaufbau von $tRNA_4^{Lys}$. Diese Sequenz als Bestandteil der Ribosomenbindungssequenz wurde bisher nur bei solchen tRNAs gefunden, die in RNA-Tumovirus-infizierten Zellen als Starter für die reverse Transkriptase fungieren können (75). Die Auffindung einer solchen tRNA in Zellen hoher Zellteilungsrate eröffnet die Möglichkeit, an einen Zusammenhang zwischen reverser Transkription und der Zellteilung zu denken.
10. Die Relation zwischen den bisher bekannten Lysin-tRNAs aus Säugerzellen läßt sich wie folgt darstellen: Ruhende

Zellen enthalten eine Lysin-tRNA mit dem Anticodon SUU (S = 2-Thio-5-carboxymethyluridinmethylester) und zwei Isoakzeptoren mit dem Anticodon CUU ($\text{tRNA}_{2A}^{\text{Lys}}$, $\text{tRNA}_{2B}^{\text{Lys}}$), die sich untereinander in einem Nukleotidpaar und von der Spezies mit dem Anticodon SUU ($\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$) durch 14 bzw. 16 Nukleotide unterscheiden. Die mit der Zellteilung assoziierte Lysin-tRNA ($\text{tRNA}_4^{\text{Lys}}$) leitet sich von einer der "normalen" tRNAs mit dem Anticodon CUU ($\text{tRNA}_{2B}^{\text{Lys}}$) ab und unterscheidet sich von dieser in den unter Punkt 8 und 9 beschriebenen Positionen.

11. Lysinspezifische tRNAs aus Kaninchenleber und E. coli werden sowohl von Synthetasen aus Leber als auch E. coli gleich gut beladen (82). Der Sequenzvergleich der entsprechenden tRNAs zeigt, daß diese Lysin-tRNAs aus E. coli und Kaninchenleber keine gemeinsamen Sequenzen enthalten, die als Erkennungssequenz für die Synthetasen in Frage kommen. Daraus folgt, daß die evolutionär bedingten unterschiedlichen Entwicklungen der tRNA-Sequenzen in Säugetier und E. coli unter Beibehaltung der für die Synthetaseerkennung wichtigen Tertiärstruktur abliefen.

7. Literaturverzeichnis

1. Geiduschek, E.P. und Haselkorn, R. (1969)
Ann. Rev. Biochem. 38, 647 - 676
2. The Mechanism of Protein Synthesis (1969)
34. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.
3. Lengyel, P. und Söll, D. (1969)
Bact. Rev. 33, 264 - 279
4. Zachau, H.G. (1969)
Angew. Chem. 81, 645 - 662
5. Lucas-Lenard, J. und Lipmann, F. (1971)
Ann. Rev. Biochem. 40, 409 - 448
6. The Genetic Code (1966)
31. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.
7. Wittmann, H.G. (1976)
Eur. J. Biochem. 61, 1 - 13
8. Holley, R.W., Apgar, J., Everett, G.A., Madison, J.T.,
Marquisee, M., Merrill, S.H., Penswick, J.R. und
Zamir, A. (1965)
Science 147, 1462 - 1464
9. Hoagland, M.B. (1960)
The Nucleic Acids, herausgegeben von Chargaff, E. und
Davidson, J.N.,
Vol. III, 349 - 408 (Academic Press New York)
10. Hoagland, M.B., Zamecnik, P.C. und Stephenson, M.L.
(1957)
Biochim. Biophys. Acta 24, 215 - 216

11. Ogata, K. und Nohara, H. (1957)
Biochim. Biophys. Acta 25, 659 - 660
12. Zachau, H.G., Dütting, D. und Feldmann, H. (1966)
Hoppe-Seyler's Zeitschr. Physiol. Chem. 347, 212 - 235
13. Sprinzl, M., Scheit, K.H., Sternbach, H., v. Haar, F.
und Cramer, F. (1973)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 51, 881 - 887
14. Sprinzl, M. und Cramer, F. (1973)
Nature New Biol. 245, 3 - 5
15. Sprinzl, M. und Cramer, F. (1973)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3049 - 3053
16. Chapville, F., Lipmann, F., v. Ehrenstein, G., Weisblum, B.,
Ray jr., W.J. und Benzer, S. (1962)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48, 1086 - 1092
17. v. Ehrenstein, G., Weisblum, B. und Benzer, S. (1963)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 49, 669 - 675
18. Richter, D., Erdmann, V. und Sprinzl, M. (1973)
Nature New Biol. 246, 132 - 138
19. Cramer, F. (1971)
Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 11, 391 - 421
20. Forget, B.G. und Weissmann, S.M. (1967)
Science 158, 1695 - 1699
21. Ofengand, J. und Henes, C. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 6241 - 6253

22. Kim, S.H., Suddath, F.L., Quigley, G.L., Mc Pherson, A.,
Sussmann, J.L., Wang, A.H.J., Seeman, A.R. und Rich, A.
(1974)
Science 185, 435 - 440
23. Robertus, J.D., Ladner, J.E., Finch, J.T., Rhodes, D.,
Brown, R.S., Clark, B.F.C. und Klug, A. (1974)
Nature 250, 546 - 551
24. Ortwerth, B.J. und Liu, L.P. (1973)
Biochem. 12, 3978 - 3984
25. Ortwerth, B.J., Yonuschot, G.R. und Carlson, J. V.
(1973)
Biochem. 12, 3985 - 3991
26. Waters, L.C., Yang, W.K., Mullin, B.C. und Nichols, J.L.
(1975)
J. Biol. Chem. 250, 6627 - 6629
27. Waters, L.C., Mullin, B.C., Ho, T. und Yang, W.K. (1975)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 2155 - 2159
28. Limburg, K. (1976)
Dissertation, Universität München
29. Rogg, H., Wehrli, W. und Staehelin, M. (1969)
Biochim. Biophys. Acta 195, 13 - 15
30. Hoskinson, R.M. und Khorana, H.G. (1965)
J. Biol. Chem. 240, 2129 - 2134
31. Pearson, R.L., Weiss, J.F. und Kelmers, A.D. (1971)
Biochim. Biophys. Acta 228, 770 - 774

32. Tener, G.M. (1967)
Methods of Enzymology, herausgegeben von Colowick, S.P.
und Kaplan, N.O.,
Academic Press Inc. New York, XII A, 398 - 404
33. Blatt, R.D., Martin, J.K., Ploesner, J.Mc.T. und
Murray, J. (1954)
J. Am. Chem. Soc. 76, 3663 - 3665
34. Madison, J.T. (1967)
Methods of Enzymology, herausgegeben von Grossman, L.
und Moldave, K.,
Academic Press Inc. New York, XI A, 137 - 139
35. Gilham, P.T. (1962)
J. Am. Chem. Soc. 84, 687 - 688
36. Ho, N.W.Y. und Gilham, P.T. (1967)
Biochem. 6, 3632 - 3639
37. Dimroth, O. (1909)
Annalen 364, 183 - 226
38. Macon, J.B. und Wolfenden, R. (1968)
Biochem. 7, 3453 - 3458
39. Brown, D.J. (1961)
Nature 189, 828 - 829
40. Wagner, D., Verheyden, J.P.H. und Moffat, J.G. (1974)
J. Org. Chem. 39, 24 - 30
41. Gross, H.J., Simsek, M., Raba, M., Limburg, K.,
Heckman, J. und RajBhandary, U.L. (1974)
Nucl. Acid. Res. 1, 35 - 43

42. Glynn, I.M. und Chappel, J.B. (1964)
Biochem. J. 90, 147 - 149
43. Richardson, C.C. (1972)
Proc. Nucl. Acid Res. 2, 815 - 828
44. Panet, A., van de Sande, J.H., Loewen, P.C., Khorana, H.G., Raae, A.J., Lillehaug, J.R. und Kleppe, K. (1973)
Biochem. 12, 5045 - 5050
45. Szekely, M. und Sanger, F. (1969)
J. Mol. Biol. 43, 607 - 617
46. Labrie, F. und Sanger, F. (1969)
Biochem. J. 114, 29P
47. Simsek, M., Ziegenmeyer, J., Heckman, J. und RajBhandary, U.L. (1973)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1041 - 1045
48. Whitfeld, P.R. und Markham, R. (1953)
Nature 171, 1151 - 1152
49. Whitfeld, P.R. (1954)
Biochem. J. 58, 390 - 394
50. Sanger, F., Brownlee, G.G. und Barrel, B.G. (1968)
J. Mol. Biol. 13, 373 - 398
51. Brownlee, G.G., Sanger, F. und Barrel, B.G. (1968)
J. Mol. Biol. 34, 379 - 412
52. Brownlee, G.G. und Sanger, F. (1969)
Eur. J. Biochem. 11, 395 - 399
53. Wintermeyer, W. und Zachau, H.G. (1973)
Biochim. Biophys. Acta 299, 82 - 90

54. RajBhandary, U.L., Simsek, M., Raba, M., Limburg, K.,
Heckman, J. und Gross, H.J. (1974)
Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 33, 1279
55. Simsek, M., Petrissant, G. und RajBhandary, U.L. (1973)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2600 - 2604
56. Simsek, M. (1975)
Ph. D. Thesis, Massachusetts Institute of Technology,
Cambridge, U.S.A.
57. Gross, H.J. unveröffentlicht
58. Crick, F.H.C. (1966)
J. Mol. Biol. 19, 548 - 555
59. Yaniv, M. und Folk, W.R. (1975)
J. Biol. Chem. 250, 3243 - 3253
60. Katze, J.R. (1975)
Biochim. Biophys. Acta 407, 392 - 398
61. Goodman, H.M., Abelson, J., Landy, A., Brenner, S.
und Smith, J.D. (1968)
Nature 217, 1019 - 1024
62. Küntzel, H. (1969)
Nature 222, 142 - 146
63. Barnett, W.E. und Brown, D.H. (1967)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57, 452 - 458
64. Matsushashi, M., Dietrich, C.P. und Strominger, J.L.
(1967)
J. Biol. Chem. 242, 3191 - 3206

65. Roberts, W.S.L., Strominger, J.L. und Söll, D. (1968)
J. Biol. Chem. 243, 749 - 756
66. Petit, J.F., Strominger, J.L. und Söll, D. (1968)
J. Biol. Chem. 243, 757 - 767
67. Stewart, T.S., Roberts, R.J. und Strominger J.L. (1971)
Nature 230, 36 - 38
68. Roberts, R.J. (1974)
J. Biol. Chem. 249, 4787 - 4796
69. Lennarz, W.J., Nesbitt III, J.A. und Reiss, J. (1966)
Biochem. 55, 934 - 941
70. Nesbitt III, J.A. und Lennarz, W.J. (1968)
J. Biol. Chem. 243, 3088 - 3095
71. Gould, R.M., Thornton, M.P., Liepkalns, v. und Lennarz,
W.J. (1968)
J. Biol. Chem. 243, 3096 - 3104
72. Kaji, A., Kaji, H. und Novelli, G.D. (1965)
J. Biol. Chem. 240, 1192 - 1197
73. Lewis, J.A. und Ames, B. (1972)
J. Biol. Chem. 66, 131 - 142
74. Gross, H.J., Stephens, E., Jungwirth, C., Winkler, J.,
Hiller, G., Bergmayer, H.P., Viehhauser, G., Bödo, G.,
Ostertag, W. und Dube, S.K. (1975)
Les Colloques de l'Institut National de la Santé et de
la Recherche Medicale: Transcription et traduction in
vitro des génomes viraux
INSERM, 47, 373 - 378

75. Leis, J.P. und Hurwitz, J. (1972)
J. Virol. 9, 130 - 142
76. Canaani, E. und Duesberg, P. (1972)
J. Virol. 10, 23 - 31
77. Dahlberg, J.E., Sawyer, R.C., Taylor, J.M., Faras, A.J.,
Levinson, W.E., Goodman, H.M. und Bishop, J.M. (1974)
J. Virol. 13, 1126 - 1133
78. Faras, A.J., Dahlberg, J.E., Sawyer, R.C., Harada, F.,
Taylor, J.M., Levinson, W.E., Bishop, J.M. und Goodman,
H.M. (1974)
J. Virol. 13, 1134 - 1142
79. Harada, F., Sawyer, R.C. und Dahlberg, J.E. (1975)
J. Biol. Chem. 250, 3487 - 3497
80. Keith, G., Ebel, J.P. und Dirheimer, G. (1974)
FEBS Letters 48, 50 - 52
81. Simsek, M., RajBhandary, U.L., Boissard, M. und
Petrissant, G. (1974)
Nature 247, 518 - 520
82. Alberty, H. und Gross, H.J., unveröffentlicht
83. Chakraborty, K., Steinschneider, A., Case, R.V. und
Mehler, A.H. (1975)
Nucl. Acid. Res. 2, 2069 - 2075
84. Sunderharadas, G., Katze, J.R., Söll, D., Königsberg, W.
und Lengyel, P. (1968)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 61, 693 - 700

85. Ray, K.L. und Söll, D. (1970)
J. Biol. Chem. 245, 1394 - 1400
86. Hayashi, H., Knowles, J.R., Katze, J.R., Lapointe, J.
und Söll, D. (1970)
J. Biol. Chem. 245, 1401 - 1406
87. Knowles, J.R., Katze, J.R., Königsberg, W. und
Söll, D. (1970)
J. Biol. Chem. 245, 1407 - 1415
88. Roe, B., Marcu, K. und Dudock, B. (1973)
Biochim. Biophys. Acta 319, 25 - 36
89. Cherayil, J.D. und Bock, R.M. (1965)
Biochem. 4, 1174 - 1183
90. Nishimura, S., Harada, F. und Seno, T. (1967)
Biochim. Biophys. Acta 142, 133 - 148
91. Gillam, J., Millward, S., Blew, D., v. Tigerstrom, M.,
Wimmer, E. und Tener, G.M. (1967)
Biochem. 6, 3043 - 3056
92. Kelmers, A.D., Novelli, G.D. und Stulberg, M.P. (1965)
J. Biol. Chem. 240, 3979 - 3983
93. Lipsett, M.N. und Heppel, L.A. (1963)
J. Am. Chem. Soc. 85, 118
94. Rushinsky, G.W., Bartos, E.M. und Sober, H.A. (1964)
Biochem. 3, 626 - 629
95. Arima, T., Uchida, T. und Egami, F. (1968)
Biochem. J. 106, 601 - 607

96. Arima, T., Uchida, T. und Egami, F. (1968)
Biochem. J. 106, 609 - 613
97. Uchida, T., Arima, T. und Egami, F. (1970)
Eur. J. Biochem. 67, 91 - 102
98. Madison, J.T., Holley, R.W., Poucher, P.H. und Connett
(1967)
Biochim. Biophys. Acta 145, 825 - 827
99. Saneyoshi, M., unveröffentlicht
100. Khym, J.X. und Cohn, W.E. (1961)
J. Biol. Chem. 236, PC 9 - 10
101. Cohn, W.E. (1962)
Acides ribonucléiques et phosphates: structure,
synthèse et fonctions,
herausgegeben von Grunberg-Manago, M. und Ebel, J. P.,
Centre National de la Recherche Scientifique, Paris,
S. 217
102. Neu, H.C. und Heppel, L.A. (1964)
J. Biol. Chem. 239, 2927 - 2934
103. Handbook of Biochemistry (53rd Edition 1972/1973)
The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio
104. Hall, R. (1971)
The Modified Nucleosides in Nucleic Acids; Columbia
University Press, New York und London
105. Holley, R.W., Everett, G.A. und Zamir, A. (1965)
J. Biol. Chem. 240, 2122 - 2128

106. Madison, J.T., Everett, G.A. und Kung, H. (1967)
J. Biol. Chem. 242, 1318 - 1328
107. Sanger, F. und Tuppy, H. (1951)
Biochem. J. 49, 463 - 481
108. Silberklang, M. und RajBhandary, U.L., unveröffent-
licht
109. Brownlee, G.G. (1972)
Determination of sequences in RNA, North-Holland Publish-
ing Company - Amsterdam · London; American Elsevier Pub-
lishing Co., Inc.-New York
110. Jay, E., Bambara, R., Padmanabhan, R., und Wu, R. (1974)
Nucl. Acid Res. 1, 331 - 353

8. Lebenslauf

- Zur Person: Am 2. April 1946 wurde ich als Sohn des Ingenieurs Hermann Raba und seiner Ehefrau Erna, geb. Wolf, in Augsburg geboren.
- Seit Dezember 1971 bin ich mit der Studienrätin Marianne Raba, geb. Herreiner, verheiratet.
- Schulbildung: Von 1952 - 1957 besuchte ich die St. Georgs-Volksschule in Augsburg sowie die Jakobsschule in Stuttgart. Von 1957 - 1962 war ich Schüler des dortigen Zeppelin- Gymnasiums. Von 1963 - 1966 besuchte ich das Max-Planck-Gymnasium in München-Pasing und legte dort im Sommer 1966 das Abitur ab.
- Studium: Vom Wintersemester 1966/67 an studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München Chemie und schloß im Sommersemester 1972 mit der mündlichen Diplom-Chemiker-Hauptprüfung ab.
- Vom November 1972 bis April 1973 fertigte ich am Max-Planck-Institut für Biochemie meine Diplomarbeit und daran anschließend bis zum Dezember 1975 meine Doktorarbeit an.

